

Der Temperatureinfluß bei der Adsorptionschromatographie von Lösungen

von

Heinz Engelhardt
aus Nürnberg

1965 № 59



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548813_0004

Meinen Eltern!

Inhaltsübersicht:

	Seite
Zusammenfassung	1
Allgemeiner Teil	
Sorptionisothermen	2
Bodentheorie	4
Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf die Höhe der Trennstufe	6
Faktoren, von denen die Trennung abhängt	
Sorptionsumilieu	10
Form der Isotherme	11
Dimension der Trennsäule	11
Korngröße	12
Störungen im Zonenverlauf	12
Einfluß der Temperatur	14
Spezieller Teil	
Experimentelle Größen zur Charakteri- sierung einer Trennung	21
Temperatureinfluß auf die Elution von Farbstoffen	24
Bestimmung der Adsorptionswärmen	26
Bestimmung der eluotropen Reihe	31
Temperatureinfluß auf die Bandenform	33
Temperatureinfluß auf die Bodenzahl	36
Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf die Bodenhöhe	38
Einfluß der Temperatur auf die Form der Isotherme	40
Abhängigkeit des Retentionsvolumens von der Substanzmenge	41
Abhängigkeit der Bodenzahl von der Substanzmenge	43

Störungen im Zonenverlauf; Einfluß der Temperatur auf das Zonenprofil	46
Elution durch programmierte Erhöhung der Temperatur	51
Experimenteller Teil	61
Literaturverzeichnis	64

Zusammenfassung.

Der Einfluß der Temperatur auf die Adsorptionschromatographie von Lösungen wurde untersucht.

Bei Erhöhung der Temperatur verringert sich das Retentionsvolumen der Substanz. Die Bindung der Stoffe am Sorbens wird schwächer und die Einstellung des Sorptionsgleichgewichtes beschleunigt. Außerdem verringert sich bei höherer Temperatur die Breite und die Asymmetrie der Substanzzonen, da die Adsorptionsisothermen wohl flacher, aber geradliniger werden. Dadurch erhöht sich die Trennleistung der Säule. Eine Steigerung der Temperatur entspricht dem Übergang zu einem stärker eluierenden Laufmittel.

Durch programmierte Erhöhung der Temperatur kann die Elution von Stoffen, die verschieden stark adsorbiert werden, verbessert und die Dauer der Trennung verkürzt werden. Dieses Verfahren gibt die gleichen Ergebnisse wie eine Gradientelution. Von Vorteil ist, daß während der Trennung das Lösungsmittel nicht verändert wird.

Das Durchhängen der Substanzzone in der Mitte der Säule konnte auf einen Temperaturunterschied zwischen der Mitte und dem Rand der Säule zurückgeführt werden. Die Steigerung der Säulentemperatur während der Trennung wirkt dieser Störung entgegen.

Allgemeiner Teil.

Bei jeder chromatographischen Trennung wird das aufzutrennende Substanzgemisch kontinuierlich zwischen einer stationären und einer mobilen Phase verteilt. Das Zusammenspiel beider Phasen, nach denen eine Unterscheidung der verschiedenen Systeme möglich ist, bezeichnet man als Sorptionsmilieu¹. Im Falle einer festen stationären Phase mit aktiver Oberfläche und einer flüssigen beweglichen Phase spricht man von Adsorptionschromatographie (LSC, liquid-solid-chromatography). Ist die stationäre Phase eine auf einen inerten festen Stoff (Träger) niedergeschlagene Flüssigkeit, so spricht man von Verteilungschromatographie (LLC, liquid-liquid-chromatography) mit flüssiger mobiler Phase. Ist die bewegte Phase ein Gas, so hat man die beiden Möglichkeiten der Gaschromatographie (GSC und GLC).

Die maßgeblichen Zustände und Vorgänge bei der Trennung, wie die verschiedenen Sorptionsgleichgewichte, der Stoffaustausch zwischen beiden Phasen, die Diffusion und die Konvektion können mehr oder minder exakt mathematisch erfaßt werden. Die allgemeine und exakte Behandlung führt jedoch zu äußerst komplizierten mathematischen Ausdrücken. Führt man vereinfachende Annahmen ein, so erhält man zwar Theorien mit beschränktem Geltungsbereich, die aber trotzdem die Erklärung für wichtige chromatographische Phänomene ergeben und sich als wertvolle Hilfe für die praktische Chromatographie erwiesen haben.

Im folgenden soll nur soweit auf die Theorie^{2, 3, 4} eingegangen werden, wie sie für die praktische Durchführung einer Trennung und zur Charakterisierung der Trennsäule notwendig ist.

Sorptionsisothermen.

Die chromatographische Trennung beruht auf der Verteilung

der Substanz zwischen zwei Phasen. Im einfachsten Fall, bei der Verteilungschromatographie, folgt diese dem Wernstschen Verteilungsgesetz. Da hier der Verteilungskoeffizient von der Konzentration der Substanz unabhängig ist, erhält man, bei konstanter Temperatur, eine lineare Abhängigkeit (Abb. 1).

Bei der Adsorptionschromatographie erfolgt die Verteilung zwischen einer festen und einer flüssigen Phase. Hier ist der Verteilungskoeffizient von der Konzentration abhängig, man erhält eine gekrümmte Isotherme, die dem Langmuirschen bzw. dem Freundlichschen Adsorptionsgesetz folgt (Abb. 2). Die gleichen Gesetzmäßigkeiten gelten sinngemäß auch bei Verwendung eines Gases als mobile Phase.

Von der Art der Isotherme hängt nun die Form der Substanzzone in der Säule ab. Bei linearer Isotherme bleibt die Form der Bande bei der Wanderung durch die Säule unverändert. Nur durch Abweichung von der idealen unmitttelbaren Gleichgewichtseinstellung, durch Diffusion und andere Prozesse verbreitern sich die Zonen symmetrisch und nähern sich der Form einer Gauss-Kurve. (Abb. 1)²

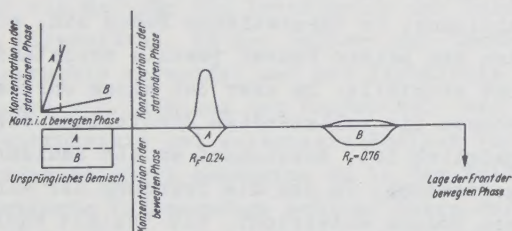


Abb. 1: Chromatographie mit linearer Isotherme

Bei einer gekrümmten Isotherme, charakteristisch für alle Adsorptionsvorgänge, erhält man stets asymmetrische Ban-

den (Abb. 2)². Sie zeigen eine steile Vorderfront, während am Ende der Zone die Konzentration der Substanz nur sehr langsam abnimmt ("tailing"). Dieses Nachhinken

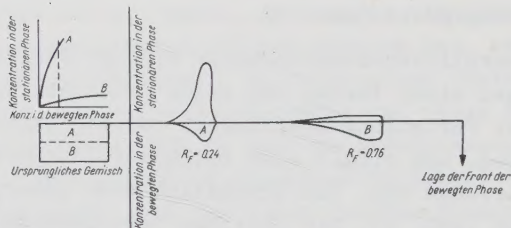


Abb. 2: Chromatographie mit nicht linearer Isotherme.

eines Teiles der Substanz wird dadurch hervorgerufen, daß die Adsorption aus verdünnten Lösungen relativ stärker ist als die aus konzentrierteren.

Bodentheorie.

Das Verhalten einer Substanzzone bei der Wanderung durch die Trennsäule wurde von A. J. P. Martin sowohl für die LLC⁵, wie auch für die GLC⁶ mit Hilfe der Bodentheorie beschrieben. Martin teilte die Säule, ähnlich einer Destillationskolonne, in theoretische Böden ein, auf denen sich zwischen den beiden Phasen jeweils vollständig das Gleichgewicht einstellt. Da aber bei einem chromatographischen Prozess die vollständige Einstellung des Gleichgewichts unmöglich ist, bezeichnet er ein Säulenstück in Strömungsrichtung, in dem die Trennung der eines theoretischen Bodens entspricht, als "height equivalent to a theoretical plate" (HETP). Diese Bodentheorie führt vor allem zum Verständnis der Verbreiterung der Banden nach einer Binominal- bzw. Poisson-Verteilung. Je mehr Verteilungsschritte eine Substanzzone durchläuft, desto

breiter wird sie. Mit dieser Theorie kann aus dem Eluierungsdiagramm (Auftragung: Konzentration gegen Zeit) die Bodenzahl berechnet werden. In diesem Diagramm erscheinen Banden, die nur kurze Zeit in der Säule sind, schmal und hoch, während Banden, die erst nach längerer Zeit eluiert werden, breit und flach sind. Das Eluierungsdiagramm gibt direkte Auskunft über die Form der Substanzzone in der Säule.

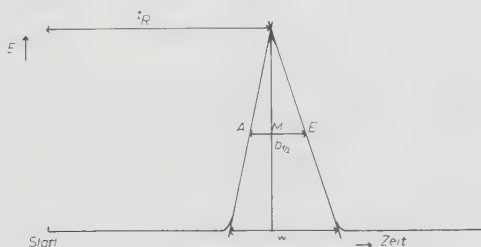


Abb. 3: Größen im Eluierungsdiagramm

Die Strecke von der Probenaufgabe ($t = 0$) bis zum Erscheinen des Peakmaximum (Abb. 3) repräsentiert die Retentionszeit t_R (min.) der Substanz. Die Retentionszeit ist ein Maß für die Verzögerung der Substanz relativ zum Fließmittel. In der Papier- und Dünnschichtchromatographie verwendet man das Verhältnis der Wanderstrecken von Substanz und Laufmittel, den R_F -Wert. Die Retentionszeit ist selbstverständlich von der Strömungsgeschwindigkeit abhängig. Da in der Zeiteinheit eine bestimmte Volumenmenge mobiler Phase durch die Säule strömt, ist die Retentionszeit dem Retentionsvolumen V_R (ml) proportional.

$$V_R = t_R \cdot u \quad (1)$$

(u = Strömungsgeschwindigkeit ml/min)

Man hat damit ein vergleichbares Maß für die Verzögerung der Substanz, aus dem die Strömungsgeschwindigkeit eliminiert ist. Das Retentionsvolumen gibt an, wieviel mobile Phase durch die Säule strömt, bis die Hälfte der Substanz am Ende der Säule eluiert ist. Für viele Zwecke ist es nicht nötig, auf Volumina umzurechnen, sondern man kann einfach die Abstände auf dem Schreiberpapier messen.

Die Bodenzahl n berechnet sich nun nach

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2)$$

wobei w die Basisbreite der Bande ist. (t_R und w in gleichen Einheiten). Bei asymmetrischen Peaks ist es günstiger, an Stelle der Basisbreite die Breite in halber Höhe des Peaks zur Berechnung der Bodenzahl zu verwenden⁷. Die Bodenzahl ergibt sich dann nach

$$n = 8 \ln 2 \cdot \left(\frac{t_R}{b_{1/2}} \right)^2 \quad (3)$$

Die Höhe der Trennstufe (HETP) berechnet sich aus der Bodenzahl und der Länge der Trennsäule L (m) nach

$$\text{HETP} = \frac{1000 L}{n} \quad (\text{mm}) \quad (4)$$

Je kleiner die Höhe einer Trennstufe ist, desto besser gelingt die Trennung eines Stoffgemisches in kurzer Zeit und mit einer kurzen Trennsäule.

Mit dieser Theorie kann man wohl das Phänomen der Bandenverbreiterung erklären, es fehlen aber vollkommen die kinetischen Erscheinungen, die sicher eine bedeutende Rolle bei der Trennung spielen.

Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf die HETP.

van Deemter, Zuiderweg und Klinkenberg⁸ (siehe auch^{2, 4}) erklärten die Bandenverbreiterung vom kinetischen Standpunkt aus und stellten eine Beziehung zwischen dem in

der Praxis verwendeten Maß, der HETP, und kinetischen Erscheinungen wie Diffusion und Massenübergang zwischen den Phasen her. Folgende drei Faktoren beeinflussen die Höhe der Trennstufe:

- 1.) Unterschiede in der Wegstrecke der mobilen Phase, die durch das Umströmen der stückigen Füllung entstehen (multiple path).
- 2.) Diffusion der Substanz während des Aufenthalts in der mobilen Phase, und
- 3.) Verzögerung des Phasenübergangs der Substanz.

Die Gleichung, die diese Gesichtspunkte mit der Höhe der Trennstufe und der Strömungsgeschwindigkeit in Zusammenhang bringt, lautet in vereinfachter Form:

$$\text{HETP} = A + B/u + C \cdot u \quad (5)$$

Die Konstanten A, B und C sind die wichtigsten Parameter für eine Trennsäule. Sie zeigen eine unterschiedliche Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit und sollen nun näher besprochen werden.

Streudiffusionskoeffizient A:

In einer gepackten Säule kann eine Verbreiterung der Zonen dadurch auftreten, daß die mobile Phase auf unterschiedlich langen Wegen durch die Säule strömt. Außerdem ist die Geschwindigkeit nicht axial gerichtet und ihre Größe hängt vom Zwischenraum zwischen den Körnern der Füllung ab. Die Konstante A ist ein Maß für die Dichte der Packung und hängt nur von der Größe und Form des Füllmaterials ab. Erfahrungsgemäß lassen sich große Teilchen leichter regelmäßig packen als kleine⁹. Die Form der Körner sollte möglichst regelmäßig sein. Gleichmäßig runde Glaskügelchen lassen sich äußerst regelmäßig packen, man erreicht dann Werte für A, die ungefähr dem Teilchendurchmesser entsprechen (siehe Gleichung 6). Die Konstante A ist unabhängig von der Art und Geschwindigkeit der mobilen Phase und von der aufgegebenen Substanz.

Molekulare Diffusion B:

Die molekulare Diffusion überlagert sich der durch den Druckabfall längs der Säule erzwungenen Fließbewegung der mobilen Phase und der darin gelösten Substanz. Die axiale Komponente der Diffusion beschleunigt den Transport der Substanz bzw. wirkt ihm entgegen. Diese Konstante ist von der Strömungsgeschwindigkeit abhängig.

Die molekulare Diffusion und die Streudiffusion stellen zusammen die Longitudinaldiffusion dar. Ihr Beitrag zur Höhe der Trennstufe ist

$$\text{HETP} = A + B/u = 2\lambda d_p + 2\gamma D_m/u \quad (6)$$

Dabei sind λ und γ Konstanten, d_p ist der Teilchendurchmesser und D_m ist die Diffusion der Substanz in der mobilen Phase.

Die Longitudinaldiffusion macht sich nur bei geringen Strömungsgeschwindigkeiten bemerkbar. Hier kann die HETP infolge der molekularen Diffusion groß und damit die Bodenzahl der Säule klein werden. Im Grenzfall, bei einer Strömungsgeschwindigkeit 0, verwaschen die Zonen vollkommen durch Diffusion, die durch das Konzentrationsgefälle hervorgerufen wird. Bei großen Strömungsgeschwindigkeiten wird der Einfluß von B vernachlässigbar (Abb. 4).

In erster Näherung ist D_m der Quadratwurzel der Dichte der mobilen Phase bzw. der Quadratwurzel des Molekulargewichts umgekehrt proportional. Das bedeutet, daß der Beitrag von B mit steigendem Molekulargewicht der mobilen Phase geringer wird. Der Diffusionskoeffizient ist bei Verwendung einer Flüssigkeit als mobiler Phase um mehrere Größenordnungen geringer als bei Verwendung eines Gases¹⁰. Deshalb fällt, im Gegensatz zur Gaschromatographie, der Beitrag des Longitudinaldiffusionsterms bei der Flüssigchromatographie nur bei extrem kleinen Strömungsgeschwindigkeiten ins Gewicht.

Verzögerung des Massenübergangs C:

Die bisher besprochenen Parameter werden durch das eigentliche Verteilungsgleichgewicht der Substanz zwischen den beiden Phasen nicht beeinflusst. Da diese Verteilung aber mit endlicher Geschwindigkeit abläuft, wird nur bei sehr kleiner Strömungsgeschwindigkeit nahezu vollkommene Gleichgewichtseinstellung eintreten. Bei größerer Geschwindigkeit werden dann sicher einzelne Moleküle der zu trennenden Substanz gegenüber der Hauptmenge verzögert, und zwar, da die Sorptionsgeschwindigkeit konstant bleibt, umso stärker, je größer die Strömungsgeschwindigkeit ist. Durch diese Verzögerung des Massenübergangs wird mit steigender Strömungsgeschwindigkeit die Höhe der Trennstufe immer größer (Abb. 4). Der Koeffizient C der van Deemter-Gleichung, mit der Dimension Zeit, ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Sorptions-Desorptions-Prozesses in oder an der stationären Phase.

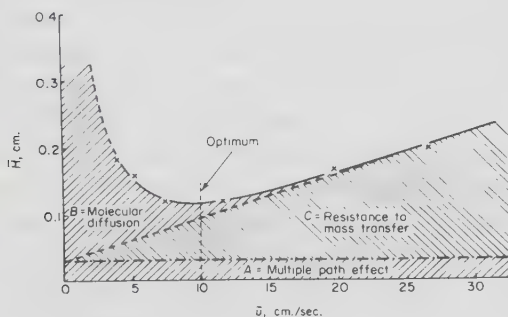


Abb. 4: Abhängigkeit der HETP von der Strömungsgeschwindigkeit (aus ⁴).

Die Höhe der Trennstufe wird sowohl bei geringen wie auch bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten vergrößert. Bei kleinen Strömungsgeschwindigkeiten ist die molekulare Diffusion die Ursache, bei großen die Verzögerung des Massen-

übergangs. Dazwischen gibt es eine optimale Strömungsgeschwindigkeit, bei der die HETP klein ist (Abb. 4). Die van-Deemter-Gleichung ist eine Hyperbelfunktion.

Die ursprünglich für die Gaschromatographie (GLC) abgeleitete van-Deemter-Gleichung ließ sich ohne weiteres auf die Gasadsorptionschromatographie übertragen¹¹ und ist nach Arbeiten von J. C. Giddings^{12, 13, 14} auch für die Flüssigchromatographie (LLC und LSC) gültig, wenn nur die entsprechenden Parameter richtig eingesetzt werden. So trägt bei der Verteilungschromatographie (GLC und LLC) die Diffusion der Substanz in der flüssigen stationären Phase entscheidend zu C bei, während sie natürlich bei der Adsorptionschromatographie (GSC und LSC) entfällt. Hier ist C in erster Linie ein Ausdruck für die Kinetik des Adsorptions-Desorptions-Vorgangs.

Faktoren, von denen die Trennung abhängt.

Eine chromatographische Trennung hängt außer von der Strömungsgeschwindigkeit, deren Einfluß die van-Deemter-Gleichung angibt, noch von verschiedenen Parametern ab, deren Kenntnis äußerst wichtig ist. Es ist aber sehr schwierig, die Einflüsse der einzelnen Parameter auseinander zu halten, da sie sich häufig überlagern.

Sorptionsmilieu:

Primär hängt eine chromatographische Trennung aber vom Zusammenspiel der stationären und der mobilen Phase, dem Sorptionsmilieu ab. Es soll im folgenden speziell auf die Adsorptionschromatographie (LSC), die Verteilung der Substanz zwischen einer festen aktiven Oberfläche und einer Flüssigkeit, eingegangen werden.

Durch die Wahl des Adsorptionsmittels (Adsorptionsmittelsreihe) und eines geeigneten Laufmittels (eluotrope Reihe) hat man die Möglichkeit, für fast alle organischen Substanzen sowohl vollkommene Adsorption wie auch vollkommene Desorption und Verdrängung zu erreichen. Selbstver-

ständig lassen sich alle gewünschten Zwischenzustände einstellen, was man praktisch bei der Elution von Substanzen anwendet. Da es schwierig ist, während des Versuches die stationäre Phase zu wechseln, wird man leichter die Polarität des Laufmittels ändern, was stufenweise oder kontinuierlich (Gradient-Elution) erfolgen kann. Man beginnt stets in einem System der vollkommenen Adsorption. Durch Steigerung der Polarität des Lösungsmittels schwächt man diese stetig ab, bis für jeden der Stoffe einmal ein Milieu zustande kommt, in dem seine Adsorption reversibel wird und seine Wanderung durch die Säule beginnt. Im Grenzfall kann man die adsorbierten Stoffe durch Zusatz eines Stoffes, der viel stärker adsorbiert wird, vom Adsorbens verdrängen. (Verdrängungsanalyse).

Form der Isotherme:

Die Form der Isotherme hat auch einen entscheidenden Einfluß auf die Trennung. Bei den für eine gekrümmte Isotherme charakteristischen Substanzbanden mit ihrem starken tailing tritt häufig Überlappung mit nachfolgenden Zonen ein. Man versucht deshalb möglichst lineare Isothermen, die symmetrische Peaks geben, zu erhalten. Bei der Adsorptionschromatographie erhält man nur bei sehr kleinen Konzentrationen (Substanzmenge $< 10^{-4}$ gr/gr Adsorbens) symmetrische Peaks, da man sich dann im linearen Anfangsbereich der Isotherme befindet. (LEAC = linear elution adsorption chromatography nach L. R. Snyder¹⁵). Lineare Isothermen erhält man auch bei schwach eluierenden Lösungsmitteln, da dann sehr verdünnte Gleichgewichtslösungen vorliegen. Um in diesem Gebiet arbeiten zu können, darf man die Elutionskraft der Waschflüssigkeit nur sehr vorsichtig steigern.

Dimension der Säule:

Durch Reihenuntersuchungen wurde gezeigt³, daß die Trenn-

wirksamkeit einer chromatographischen Säule umso größer ist, je größer das Verhältnis L/D^2 (L = Länge, D = Durchmesser der Säule) ist. Ideale Trennungen erhält man also in sehr langen und sehr dünnen Säulen, wie sie in der Gaschromatographie verwendet werden. Der Verwendung solcher dünner Säulen in der Flüssigchromatographie steht ihre geringe Filtriergeschwindigkeit entgegen. Gase haben eine viel geringere Viskosität als Flüssigkeiten. Außerdem kann ein Gasstrom viel leichter durch Vergrößerung des Druckgefälles beschleunigt werden als ein Flüssigkeitsstrom. Für die Flüssigchromatographie verwendet man deshalb im allgemeinen dickere Säulen.

Korngröße:

Der Einfluß der Korngröße auf die Bodenhöhe ist in der Konstanten A der van-Deemter-Gleichung enthalten. Die Korngröße beeinflusst aber auch die Strömungsgeschwindigkeit und die Sorptionsgeschwindigkeit. Mit abnehmender Korngröße steigt der Strömungswiderstand der Packung stark an. Andererseits wird die Geschwindigkeit der Einstellung des Sorptionsgleichgewichts größer. Die Korngröße hat deshalb auch einen Einfluß auf den Koeffizienten des Massenübergangs C . In der Praxis wird man daher eine mittlere Korngröße verwenden, die einerseits noch eine günstige Strömungsgeschwindigkeit ergibt, bei der andererseits aber auch noch die Einstellung des Gleichgewichts in kurzer Zeit möglich ist.

Störungen im Zonenverlauf:

Eine Trennung verschlechtert sich auch durch hydrodynamische Störungen in der Säule. Diese Störungen sind in den abgeleiteten Gleichungen nicht enthalten, da man bei allen Ableitungen annimmt, daß die Lösungen in der Trennsäule pfropfenartig fließen ("ideal plug flow"). Neben solchen Effekten wie Rückvermischung und unterschiedliche Strömungsgeschwindigkeiten durch ungleichmäßige Packungs-

dichte, die bereits in der van-Deemter-Gleichung berücksichtigt sind, spielen auch Dichte- und Viskositätsunterschiede der Laufmittel eine Rolle. Diese Unterschiede verursachen eine Instabilität der Front zwischen zwei Lösungen, wenn die obere Schicht die größere Dichte oder die geringere Viskosität besitzt (sog. Taylor-Instabilitäten¹⁶). Die treibende Flüssigkeit mit größerer Dichte oder geringerer Viskosität dringt in tiefen, charakteristischen Beulen in die getriebene Flüssigkeit ein ("fingering"). Diese Effekte treten besonders bei hochkonzentrierten Lösungen und bei der Verdrängung eines Lösungsmittels durch ein anderes auf.

Aber auch die Strömung eines reinen Laufmittels kann durch Unterschiede in der Packungsdichte zwischen Mitte und Rand der Trennsäule gestört sein. In der Gaschromatographie wurde gefunden, daß die Wandergeschwindigkeit am Rand der Säule größer ist als in der Mitte¹⁷. Die größte Geschwindigkeit des Gases wurde im Abstand einer Korngröße vom Rand gefunden¹⁸. Auch bei der Verteilungschromatographie (LLC)¹⁹ und bei der Verwendung von Ionenaustauschern²⁰ wurde gefunden, daß die Substanzzone am Rande

der Säule schneller wandert als in der Mitte.

Bei der Adsorptionschromatographie (LSC) dagegen kann sehr leicht ein Vorlauf der Zone in der Mitte der Säule beobachtet werden, da Kieselgelsäulen mit einigen Laufmitteln durchscheinend werden. Diese Abweichungen vom "ideal plug flow" können eine bereits erfolgte Trennung

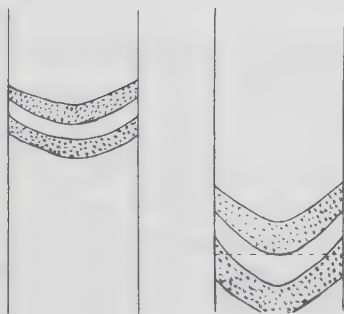


Abb. 5: Zonenprofile.

zweier Stoffe durch Vermischung wieder zunichte machen (Abb. 5). Obwohl beide Stoffe in der Säule vollkommen voneinander getrennt vorliegen, werden sie am Auslauf wieder vermischt, da sie im Querschnitt nicht hintereinander, sondern teilweise nebeneinander vorliegen. Durch diese Störungen erhöht sich die wirkliche Breite der Bande, was sich in kleineren Bodenzahlen bemerkbar macht.

Einfluß der Temperatur:

Der Einfluß der Temperatur auf die chromatographische Trennung wurde bisher nur in der Gas- und in der Ionenaustauschchromatographie ausführlich untersucht.

In der Gaschromatographie spielt die Temperatur eine entscheidende Rolle²¹. Von ihr hängen die Löslichkeitsverhältnisse der Stoffe in der Trennflüssigkeit, die Viskosität von Trägergas und Trennflüssigkeit, die Gasgeschwindigkeit und die Geschwindigkeit des Massenübergangs zwischen mobiler und stationärer Phase ab. Daher ändern sich selbstverständlich die Retentionsvolumina mit der Temperatur. Experimentell wurde gefunden²², daß der Logarithmus der spezifischen Retentionsvolumina sich linear mit der absoluten Temperatur ändert.

$$\log V_S \sim 1/T \quad (7)$$

Das spezifische Retentionsvolumen V_S berechnet sich nach

$$V_S = \frac{V_R - V_T}{M} \quad (8)$$

wobei V_T das Totvolumen der Säule darstellt und M die Menge der stationären Phase (gr) ist. Bei Verwendung von aktiven stationären Phasen kann man auch ein auf die Oberfläche der stationären Phase bezogenes spezifisches Retentionsvolumen verwenden

$$V_F = \frac{V_R - V_T}{F} \quad (8a)$$

wobei F die Oberfläche in m^2/gr ist.

Nachdem in den meisten Fällen sowohl das Totvolumen wie auch die Menge der stationären Phase konstant bleiben, kann an Stelle des spezifischen Retentionsvolumen das Retentionsvolumen V_R gesetzt werden.

Beim Auftragen von $\log V_R = f(1/T)$ erhält man eine Gerade, deren Steigung ein Maß für die Lösungswärme darstellt. (Ableitung siehe ⁴, Seite 78 ff).

$$\operatorname{tg} \alpha = - \frac{\Delta H}{2,3 R} ;$$

$$- \Delta H = 2,3 R \cdot \operatorname{tg} \alpha \quad (9)$$

$-\Delta H$ = Lösungswärme, R = Gaskonstante ($1,987 \text{ cal Grad}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$)

Das gleiche gilt auch für die Gasadsorptionschromatographie (GSC), nur muß hier folgerichtig an Stelle der Lösungswärme die Adsorptionswärme gesetzt werden²³.

Der Nernstsche Verteilungskoeffizient ist ebenfalls temperaturabhängig, wodurch sich bisweilen die Selektivität der Trennsäule mit der Temperatur ändert. Das kann so weit gehen, daß die Elutionsfolge von Substanzen umgekehrt wird. Die Temperatur beeinflusst aber auch die Trennleistung und damit die Höhe der Trennstufe. Es ergibt sich für jede Trennsäule eine optimale Arbeitstemperatur²⁴.

Der starke Temperatureinfluß wurde auch zur Verbesserung der Trennungen ausgenützt, indem die Temperatur programmiert verändert wurde. Prinzipiell gibt es dazu zwei verschiedene Möglichkeiten.

Bei der Thermo-Gaschromatographie (Chromathermographie), einer von russischen Autoren²⁵ entwickelten Methode, läuft der Säule ein Temperaturfeld entlang. Man erreicht dies, indem ein beweglicher Ofen entlang der Trennsäule zum Säulenausgang bewegt wird. Der Ofen ist so konstruiert, daß an seiner Front niedrigere und am Ende wesentlich höhere Temperatur herrscht. Die Stoffe verteilen

sich nun entlang dieses Temperaturgradienten und zwar die leichtflüchtigen in der kälteren, die schwerer flüchtigen in der heißeren Region. Schließlich erreicht der Ofen das Säulenende, das in den Detektor einmündet. Dort werden die Substanzen in der Reihenfolge ihres Erscheinens registriert. Im Unterschied zur herkömmlichen Gaschromatographie wird die Probe nicht dem Trägergasstrom zuge-mischt, sondern das Analysengemisch strömt kontinuierlich in die Trennsäule. Diese Verfahren eignet sich besonders zur Spurenanalyse gasförmiger Stoffe.

Bei der anderen Methode, der temperaturprogrammierten Gaschromatographie (PTGC)⁴, ist die Temperatur entlang der ganzen Säule gleich, aber sie steigt regelmäßig (programmiert) mit der Zeit an. Das Temperaturprogramm beeinflusst sowohl die Geschwindigkeit des Trägergases als auch die Wandergeschwindigkeit der Substanzzone. Beide Einflüsse ergeben die Temperaturabhängigkeit der Retentionsvolumina. Mit der PTGC kann man Gemische mit weitem Siedebereich in kürzerer Zeit trennen, außerdem sind die Elutionspeaks viel einheitlicher. Auch die spät eluierten Banden sind schmal und hoch^{26, 27}. Die Trennleistung steigt nur formal an, und die Erscheinung, daß die Peaks annähernd gleich breit bleiben, hält nur so lange an, solange die Temperatur ansteigt. Die schärferen Peaks mögen davon herrühren, daß beim Austritt aus der Säule das hintere Ende der Bande sich bei einer höheren Temperatur befindet und dadurch gestaucht wird. Die PTGC bringt eine Verkürzung der Analysenzeit und eine Verbesserung der quantitativen Auswertung, da die Peaks symmetrischer werden.

Auch in der Ionenaustauschchromatographie wurde der Temperatureinfluß eingehend untersucht²⁸; auch wurden Temperaturveränderungen zur Verbesserung der Trennungen angewendet²⁹. Mit steigender Temperatur erhöht sich die Beweglichkeit der Ionen am Austauscher, und zwar steigt

sie im allgemeinen stärker an als in der wässrigen Phase. Durch diese erhöhte Ionenbeweglichkeit steigt die Geschwindigkeit des Austausches bei Temperaturerhöhung. Der Einfluß auf die Gleichgewichtslage des Austausches selbst ist sehr gering, da er im allgemeinen mit geringer Wärmetönung abläuft. Nur die Neutralisation des Austauschers zeigt erhebliche Wärmetönung³⁰, sie wird aber kaum von einer Temperaturänderung beeinflusst. Die Selektivität des Austauschers sinkt mit steigender Temperatur. Bei tiefer Temperatur hat die nicht-ionische Sorption oft einen bedeutenden Einfluß auf die Trennung, z. B. bei Aminosäuren. Bei höherer Temperatur werden diese nicht-ionischen Bindungskräfte geschwächt und es überwiegt die ionische Sorption. Dadurch ändern sich die relativen Wandergeschwindigkeiten der Aminosäuren. Die stärkste Änderung erfahren die Aminosäuren, die mit der Matrix des Austauschers in starke Wechselwirkung treten³¹. Bei der Untersuchung des Temperatureinflusses auf das Anionenaustauschverhalten der seltenen Erden, in Gegenwart von Äthylendiamintetraessigsäure, wurde neben einer Verringerung der Bodenhöhe auch eine Veränderung des Verteilungskoeffizienten einzelner Ionen gefunden³². Bei der Sorption von Bromidionen an einem Austauscher ergab sich für $\log V_R = f(1/T)$ keine Gerade, d. h. die Sorptionswärme für diese Ionen ist nicht konstant³³.

Bei der Verteilungschromatographie, wie auch bei der Papierchromatographie wurde bisher mehr Wert auf die Konstanthaltung der Temperatur gelegt, um überhaupt die R_F -Werte reproduzieren zu können. Der Temperatureinfluß wurde noch nicht untersucht. Eine Abhängigkeit von der Temperatur ergibt sich vor allem in der Fließgeschwindigkeit und damit in der Entwicklungsdauer. Bei einer Verteilungschromatographie an wasserhaltigem Kieselgel und einem Gemisch aus Kohlenwasserstoffen und Methyläthylketon als mobiler Phase wurde gefunden, daß bei höherer

Temperatur die Stoffe stärker zurückgehalten werden³⁴.

Da bis jetzt kein Vorteil festgestellt wurde, der sich aus Temperaturänderungen ergibt, wurden die meisten adsorptionschromatographischen Trennungen (ISC) bei Raumtemperatur durchgeführt. Daher ist noch wenig über den Temperatureinfluß auf diese Trennungen bekannt. So wurde wohl beobachtet³⁵, daß manche Stoffe bei höherer Temperatur etwas schneller durch die Säule wandern als bei Raumtemperatur. Andere berichten dagegen³⁶, daß in einem begrenzten Temperaturbereich kein Einfluß der Temperatur auf das Retentionsvolumen zu beobachten ist. Über den weiten Temperaturbereich von -50°C bis $+200^{\circ}\text{C}$ wurde das Verhalten von Azofarbstoffen an Kieselgel untersucht³⁷. Dabei wurde kein einheitliches Verhalten beobachtet. Einige R_F -Werte stiegen mit der Temperatur an, einige wurden kleiner und andere wurden überhaupt nicht beeinflußt. Von ungarischen Autoren³⁸ wurden ebenfalls chromatographische Trennungen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt und keine Veränderungen festgestellt. Nur in einem Fall, bei der Trennung eines komplexen Gemisches (schwefelhaltiges Erdöl), wurde eine Verbesserung der Trennung bemerkt. Bei der Trennung von Zuckern an Aktivkohle wurde gezeigt, daß bei höherer Temperatur die Desorption steigt, wodurch die Trennung beschleunigt werden kann³⁹.

Auch Temperaturgradienten wurden in der Flüssigchromatographie zur Auftrennung von Polymeren verwendet. In den meisten Fällen wurde der Gradient so angelegt, daß am Anfang die Trennsäule bei höherer Temperatur war als am Ende, jeder Punkt der Säule also eine andere Temperatur hatte^{40, 41, 42}. Als stationäre Phasen wurden inaktive Stoffe wie Glasperlen und Sand verwendet. Die Auftrennung der Polymeren erfolgte nach steigendem Molekulargewicht. Auch mit programmierter Erhöhung der Säulentemperatur konnte an Celite Polyäthylen nach steigendem Molekular-

gewicht aufgetrennt werden⁴³. In allen diesen Fällen beruht die Trennung hauptsächlich auf Lösungseffekten. Es handelt sich mehr um eine kontinuierliche fraktionierte Kristallisation⁴⁰ als um eine Trennung, die auf einem Sorptionsgleichgewicht beruht.

Vom theoretischen Standpunkt sind verschiedene Möglichkeiten eines Temperatureinflusses auf die chromatographische Trennung (LSC) gegeben.

Mit steigender Temperatur sinkt die Viskosität der mobilen Phase; dadurch erhöht sich die Permeabilität der Säule, was sich, bei gleichem Druckabfall, in einer größeren Strömungsgeschwindigkeit äußert. Die Erhöhung der Permeabilität wird nur durch die Abnahme der Viskosität mit steigender Temperatur hervorgerufen⁴⁴. Mit sinkender Viskosität des Laufmittels steigt die Diffusion der gelösten Stoffe zur stationären Phase; dadurch beeinflusst die Änderung der Temperatur auch die Geschwindigkeit des Massenübergangs. Die Konstante C der van-Deemter-Gleichung ist ein direktes Maß für die Geschwindigkeit des Massenübergangs. Eine Erhöhung dieser Geschwindigkeit äußert sich in einer Verringerung der Bodenhöhe und damit einer Verbesserung der Trennung. Die durch Sinken der Viskosität hervorgerufene Erhöhung der Filtriergeschwindigkeit (Konstante B) wirkt dem entgegen, so daß sich beide Effekte gegenseitig aufheben können.

Auch die Adsorption, ein exothermer Vorgang, wird durch Temperaturänderung beeinflusst. Mit steigender Temperatur wird die adsorbierte Menge kleiner. Die Isothermen werden bei höherer Temperatur flacher und geradliniger⁴⁵. Systeme mit umgekehrtem Temperatureffekt, steigende Adsorption mit steigender Temperatur, sind kaum bekannt⁴⁶. Wenn bei der Adsorption eine Abkühlung des Systems beobachtet wurde, handelte es sich stets um die Adsorption einer Substanz, die in Lösung stark assoziiert war. Die

Dissoziationsenergie war dann größer als die freiwerdende Adsorptionswärme. Alle diese Stoffe zeigen bei der Adsorption aus polaren Lösungsmitteln normales Verhalten. Dieser Fall dürfte bei der Adsorptionschromatographie kaum auftreten, so daß stets bei einer Erhöhung der Temperatur eine Verringerung der Adsorption zu erwarten ist.

Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluß einer Temperaturänderung auf das Verhalten von Einzelsubstanzen und Gemischen bekannter Zusammensetzung bei der Adsorptionschromatographie (LSC) zu untersuchen.

Spezieller Teil.

Experimentelle Größen zur Charakterisierung der Trennung.

Die Verzögerung der gelösten Substanz gegenüber dem Fließmittel ist ein Maß für den Aufenthalt in oder an der stationären Phase und kann zur Bestimmung der Stärke der Sorption dienen. Ein stark adsorbierter Stoff wird länger zurückgehalten als ein schwach adsorbierter und wird am Auslauf nach dem schwächer adsorbierten erscheinen.

Bei der Säulenchromatographie ist es schwierig, die Größe dieser Verzögerung zu bestimmen. In der Papier- und Dünnschichtchromatographie bedient man sich des R_F -Wertes, da man sehr leicht die Wanderstrecken des Laufmittels und der Substanz ausmessen kann. In der Säulenchromatographie kann der gleiche Wert nur dann verwendet werden, wenn man die stationäre Phase trocken in die Säule füllt, die Lösung aufgibt und mit reinem Lösungsmittel solange nachwäscht, bis die Front in die Nähe des Säulendes gewandert ist, aber noch nicht abtropft. Die Bestimmung der Verzögerung der Substanz nach dieser Methode ist aber mit starken Fehlern behaftet, da es sehr schwierig ist, das Pulver trocken gleichmäßig einzufüllen. Man erhält nur in den seltensten Fällen eine gerade Lösungsmittelfront und ebene Substanzzonen. Auch wird die Luft nur unvollkommen verdrängt, so daß die eingeschlossenen Luftblasen zusätzlich störend wirken. Gleichmäßigere Säulenfüllungen erhält man dann, wenn man eine Aufschlammung der stationären Phase einfüllt. Da aber dann die Säule schon befeuchtet ist, läßt sich der R_F -Wert nicht mehr bestimmen. In diesem Falle kann man dem Gemisch einen gefärbten Stoff zusetzen, der im verwendeten System nicht festgehalten wird, also die Front markiert.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß man im Eluat eine konzentrationsabhängige Größe bestimmt und das Meß-

ergebnis in Abhängigkeit von der Zeit registriert. Mit diesem, bis jetzt vor allem in der Gaschromatographie verwendeten Verfahren, erhält man direkte Angaben über die Retention, die Breite und die Form der Substanzzone und über die Konzentration der Substanz in der mobilen Phase, wenn die Zone die Säule verläßt. Aus einer solchen Kurve kann dann auch die Bodenzahl der Säule berechnet werden.

In der Flüssigchromatographie ist die optische Durchlässigkeit des Eluats, bei konstanter Wellenlänge, ein bequem zu bestimmendes Maß für seine Zusammensetzung. Dazu wird das Eluat der Säule durch eine Durchflußküvette geleitet, die sich im Strahlengang eines Spektralphotometers befindet. Der Photostrom kann geeignet verstärkt und mit einem Linienschreiber in Abhängigkeit von der Zeit registriert werden. (Genaue Beschreibung im experimentellen Teil).

Zur Kontrolle und Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit wurde das Eluat mit einem Fraktionssammler, der nach konstanter Zeit die Vorlage wechselt, in einzelne Fraktionen zerlegt, deren Volumen bestimmt wurde.

Aus der so gemessenen Strömungsgeschwindigkeit und der Retentionszeit wurde das Retentionsvolumen berechnet. Da bei den häufig sehr flachen und breiten Peaks das Maximum schwer bestimmbar war, wurde stets der Schnittpunkt der Tangenten als Retentionszeit angenommen. (Siehe Abb. 3).

Um die Temperatur der Trennsäule konstanthalten bzw. verändern zu können, wurde sie, ähnlich einem Liebigkühler, mit einem Mantel versehen, durch den Wasser bestimmter Temperatur aus einem Ultrathermostaten gepumpt wurde. Durch Messung mit Thermoelementen wurde festgestellt, daß die Temperatur der Säule mit der des Thermostaten übereinstimmte.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, mußte die

Füllung der Säule standardisiert werden. Am Anfang ergaben die Säulen bei gleicher Menge Adsorbens und gleichen Druckabfall recht unterschiedliche Filtriergeschwindigkeiten und die Stoffe hatten unter gleichen äußeren Bedingungen sehr unterschiedliche Retentionsvolumina. Es zeigte sich, daß diese Unterschiede nur von der Füllmethode herrührten. Daher wurde die Säule mit 50 gr Aluminiumoxid stets in der gleichen Weise gefüllt, so daß man immer eine Füllhöhe von 45 cm erhielt. (Siehe experimenteller Teil).

Die Art der Probenaufgabe hat einen nicht unbedeutenden Einfluß auf die Trennung. Die Probe soll in kleinem Volumen gelöst, möglichst als "Pfropfen" aufgegeben werden². Diese Forderung für die Gaschromatographie gilt auch für die Flüssigchromatographie, was folgende Versuchsdaten veranschaulichen mögen: Auf die gleiche Trennsäule wurden je 5 mg Azobenzol, einmal gelöst in 1 ml Xylol, das andere Mal in 10 ml Xylol gelöst, aufgegeben. Bei etwa gleichem Retentionsvolumen (65 bzw. 60 ml) erhielt man aus dem Eluierungsdiagramm das erste Mal eine Bodenzahl von 168, und bei der Aufgabe der gleichen Substanzmenge in 10 ml Xylol nur mehr eine Bodenzahl von 78. Bei einer Vergrößerung des Probenvolumens und gleichbleibender Substanzmenge von 1 ml auf 10 ml sinkt die Bodenzahl auf etwa die Hälfte ab. Um diesen Einfluß auszuschalten, wurde bei fast allen Versuchen das Probenvolumen konstant gehalten. Die Substanz war stets in 2 ml Lösungsmittel gelöst.

Als Testsubstanzen wurden Farbstoffe verwendet, die zur Aktivitätsbestimmung von Säulenmaterial dienen. Nach H. Brockmann⁴⁷ bestimmt man die Aktivität aus der Verteilung bestimmter Farbstoffe an einer Säule gegebener Abmessungen bei Verwendung konstanter Mengen von Lösungsmittel. Die Farbstoffe, nach steigender Polarität ge-

ordnet, sind folgende: Azobenzol, p-Methoxyazobenzol, Sudan II, Sudan III, p-Aminoazobenzol und p-Hydroxyazobenzol. Diese Farbstoffe sind so ausgewählt, daß die polaren an einer Säule hoher Aktivität nicht mehr eluiert werden, während die unpolaren an Säulen niedriger Aktivität nicht festgehalten werden und mit der Front des Lösungsmittels ausgewaschen werden.

Temperatureinfluß auf die Elution von Azobenzol

an einer Säule mit Al_2O_3 (Woelm) basisch, Aktivität I; Laufmittel Xylol.

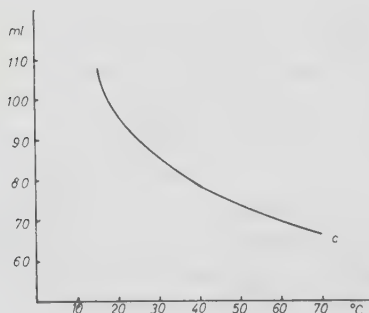


Abb. 6:
Abhängigkeit des
Retentionsvolumen von
Azobenzol von der
Temperatur.

Das Retentionsvolumen nimmt von 107 ml bei 15° C auf 68 ml bei 65° C ab. Bei noch höherer Temperatur konnte nicht mehr gemessen werden, da der Dampfdruck des Lösungsmittels dann bereits so hoch ist, daß kleine Gasblasen die homogene Säulenfüllung zerstören. Auch machte sich erhöhte katalytische Aktivität des Adsorbens bemerkbar, die Substanzzone färbte sich dunkel und wurde auch bei längerem Waschen nicht mehr eluiert. Die polarerer Brockmannschen Farbstoffe konnten auch bei höherer Temperatur nicht eluiert werden.

Um die katalytische Aktivität zu verringern und um auch die polaren Stoffe trennen zu können, wurde das Al_2O_3

der Aktivität I zuerst durch Vorbelegung mit Wasser auf Aktivität II eingestellt⁴⁸. Dem Xylol wurde die isotonische Wassermenge von 0,012% zugegeben⁴⁹. Trotzdem war die Säule nach Verwendung bei höherer Temperatur aktiver als vorher. In den kälteren Teilen der Apparatur wurden Wassertröpfchen beobachtet. Das Laufmittel wäscht, bei höherer Temperatur, mehr Wasser aus der Trennsäule als bei Raumtemperatur, bei der die isotonischen Wassergehalte bestimmt wurden. An Stelle von Wasser wurden auch höhere Alkohole zur Desaktivierung verwendet⁴⁹, die von unpolaren Laufmitteln nicht so leicht ausgewaschen werden. Am geringsten wird bei Raumtemperatur Glycerin ausgewaschen. Für die weitere Untersuchung des Temperatureinflusses wurde daher mit 3% Glycerin vorbelegtes Aluminiumoxid der Aktivität II verwendet. Ein Auswaschen des Glycerins wurde auch bei höherer Temperatur nicht beobachtet.

Tabelle I

Retentionsvolumina von p-Aminoazobenzol
an Al_2O_3 (Woelm) basisch, 3% Glycerin;
Laufmittel: Xylol

Versuch	Temperatur	Retentionsvolumen
1	20° C	216 ml
2	60	96
3	60	97
4	20	200
5	60	96
6	60	98
7	20	205

Wie aus den Werten der Tabelle I hervorgeht, erhält man bei der Ausgangstemperatur wieder das ursprüngliche Retentionsvolumen, auch wenn die Säule zwischendurch bei höherer Temperatur verwendet worden war. Man kann daher die gleiche Säule mehrmals hintereinander benützen und

bei verschiedenen Temperaturen Trennungen durchführen.

Einfluß der Temperatur auf die Elution von Sudan II,
Sudan III und p-Aminoazobenzol

an einer Säule mit Al_2O_3 (Woelm) basisch, 3% Glycerin;
Laufmittel: Xylol.

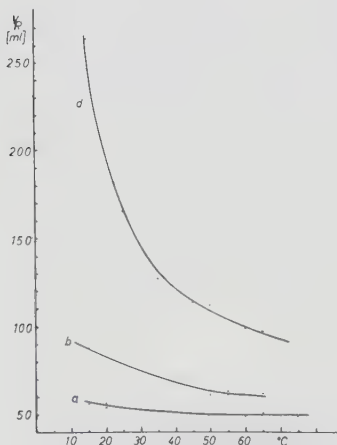


Abb. 7
Abhängigkeit des
Retentionsvolumen von
Sudan II (a),
Sudan III (b) und
p-Aminoazobenzol (d)
von der Temperatur.

Aus den Kurven geht hervor, daß der am stärksten zurückgehaltene Farbstoff (p-Aminoazobenzol) auch die größte Temperaturabhängigkeit zeigt, während der nur sehr wenig festgehaltene Farbstoff (Sudan II) kaum eine Änderung erfährt. Bei 55° C wird er nicht mehr festgehalten, er bricht mit der Front durch, denn das Totvolumen, die Summe der freien Volumina zwischen Probenaufgabe und Meßstelle, wurde zu 50 ml bestimmt.

Bestimmung der Adsorptionswärmen.

Wie bereits ausgeführt wurde, ist die Temperaturabhängigkeit des Retentionsvolumen ein Maß für die Sorptionsenergie. Theoretisch müßte man beim Auftragen von

$\log V_R = f(1/T)$ eine Gerade erhalten. Dies wurde zuerst bei der Gaschromatographie experimentell gefunden²² und dann später thermodynamisch abgeleitet und die Gültigkeit auch für die Gasadsorptionschromatographie bewiesen². Betrachtet man die Abhängigkeit des Retentionsvolumens bei der Gaschromatographie (GLC) für eine homologe Reihe genau, so findet man z. B. bei den Alkoholen durchaus lineare Abhängigkeit, allerdings nur bei den höheren Gliedern der Reihe, nicht bei den Anfangsgliedern Methanol und Äthanol. Bei diesen sehr polaren Substanzen erhält man keine lineare Abhängigkeit des Retentionsvolumens von der Temperatur mehr. Man erklärt das dadurch, daß die Sorption hier nicht mehr ausschließlich dem Verteilungssatz folgt, sondern daß sich hier andere Effekte, die eine Verzögerung der Stoffe bewirken, bemerkbar machen. So kann die Sorption auch an der Oberfläche der stationären Phase durch Wasserstoffbrückenbindung erfolgen, oder durch Adsorption am Träger der stationären Phase. Es tritt eine Überlagerung mehrerer Effekte ein und man erhält die Wärmetönung einer Mischsorption. Es ist daher nicht verwunderlich, daß man bei der Adsorption von Substanzen aus Lösungen an einer aktiven Oberfläche keine lineare Abhängigkeit des Logarithmus des Retentionsvolumens von der reziproken Temperatur erhält.

Die aktive Oberfläche des Aluminiumoxids enthält Zentren verschiedener Aktivität, so daß keine einheitliche Adsorption stattfindet. Bei Vorbelegung des Oxids mit Wasser bzw. Glycerin werden nur die aktivsten Zentren belegt; eine einheitliche Oberfläche, d. h. mit Stellen gleicher Aktivität erhält man dabei sicherlich nicht.

Die Kurven (Abb. 8) weichen umso stärker von der Geraden ab, je stärker der Stoff vom Sorbens festgehalten wird. Nur bei sehr schwach adsorbierten Substanzen (Sudan II) erhält man eine Gerade. Hier scheint also die Adsorption

an Zentren einheitlicher Aktivität stattzufinden; sicherlich nur an den aktivsten Zentren, während die schwächeren nicht mehr in der Lage sind, im verwendeten System die Substanz zu binden, da ja gleichzeitig das Lösungsmittel in großem Überschuß vorhanden ist und mit dem Farbstoff in Konkurrenz um die aktiven Zentren tritt.

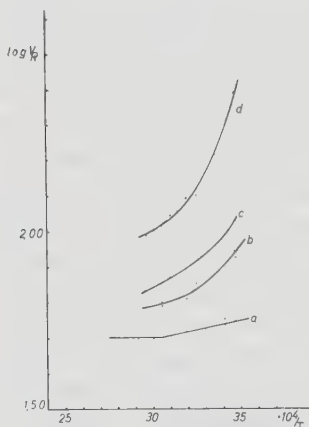


Abb. 8:

$$\log V_R = f(1/T)$$

für

Azobenzol (c),

Sudan II (a),

Sudan III (b) und

p-Aminoazobenzol (d).

Leider folgen die Kurven nicht einfachen Gleichungen, so daß es nicht möglich ist, die Steigung der Kurve ($\operatorname{tg} \alpha$) bei jeder gewünschten Temperatur zu bestimmen. Daher wurde an Stelle des Differentialquotienten der Differenzenquotient zwischen zwei Punkten bestimmt. Die Adsorptionswärme berechnet sich nach Gleichung (9). (Seite 15).

$$-\Delta H_{\text{Ads}} = 4,57 \operatorname{tg} \alpha \text{ (kcal/Mol)}$$

Aus den Kurven (Abb. 8) wurden folgende Werte berechnet:

Azobenzol an Al_2O_3 (Woelm) basisch, Aktivität I

$$\text{bei Raumtemperatur} \quad -\Delta H_{\text{Ads.}} = 7,25 \text{ kcal/Mol}$$

$$\text{bei etwa } 60^\circ \text{ C} \quad -\Delta H_{\text{Ads.}} = 1,96 \text{ kcal/Mol}$$

p-Aminoazobenzol an Al_2O_3 (Woelm) basisch, 3% Glycerin
bei Raumtemperatur $-\Delta H_{\text{Ads.}} = 12,3 \text{ kcal/Mol}$

bei etwa 60°C $-\Delta H_{\text{Ads.}} = 2,3 \text{ kcal/Mol}$

Sudan III an Al_2O_3 (Woelm) basisch, 3% Glycerin

bei Raumtemperatur $-\Delta H_{\text{Ads.}} = 4,57 \text{ kcal/Mol}$

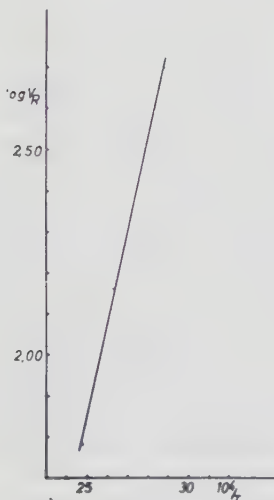
bei etwa 60°C $-\Delta H_{\text{Ads.}} = 0,98 \text{ kcal/Mol}$

Sudan II an Al_2O_3 (Woelm) basisch, 3% Glycerin

$-\Delta H_{\text{Ads.}} = 0,98 \text{ kcal/Mol}$

Die Adsorptionswärme des Lösungsmittels (Xylol) wurde

gaschromatographisch bestimmt. An einer Säule mit basischem Aluminiumoxid (3% Glycerin) wurde die Temperaturabhängigkeit des Retentionsvolumens von Xylol bei Verwendung von Helium als Trägergas aufgenommen (Abb. 9).



Aus der Steigung der Kurve berechnet sich eine Adsorptionswärme von
 $-\Delta H_{\text{Ads}} = 21 \text{ kcal/Mol.}$

Werte für die Adsorptionswärme von Xylol an Al_2O_3 (Woelm) sind noch nicht bekannt; an einem Oxid unbekannter Aktivität wurde kalorimetrisch für Xylol eine Adsorptionswärme von

Abb. 9:

$$\log V_R = f(1/T)$$

für Xylol

16,6 kcal/Mol bestimmt⁵⁰. Nur um einen Größenvergleich angeben zu können, wurden aus Kurven^{21, 22} die Verdampfungswärmen von Xylol aus verschiedenen stationären Phasen bestimmt. So ergibt sich bei Verwendung von Sili-

konöl als stationärer Phase eine Verdampfungswärme von 4,8 kcal/Mol, wird eine polarere Phase verwendet (Tri-tolylphosphat), so ergeben sich Werte zwischen 8,9 und 9,6 kcal/Mol. Die Adsorptionswärme von CO_2 an Kieselgel wurde gaschromatographisch zu 8,6 kcal/Mol bestimmt². Ein Vergleich der in der Flüssigchromatographie bestimmten Werte mit diesen Literaturwerten zeigt, daß sich die Adsorptionswärmen in der gleichen Größenordnung bewegen.

Die Größe der Adsorptionswärme ist maßgebend dafür, wie stark eine Substanz zurückgehalten wird. Ein Stoff mit einer kleinen Adsorptionswärme (Sudan II) wird nur sehr wenig zurückgehalten. Dagegen wird ein Stoff mit einer großen Adsorptionswärme nur sehr langsam eluiert, er hat ein großes Retentionsvolumen. Bei der Flüssigchromatographie ist zu beachten, daß die gemessene Adsorptionswärme die Differenz zwischen der Adsorptionswärme der Substanz und der des Lösungsmittels darstellt. Die Stärke der Retention eines Stoffes hängt also von der Differenz seiner Adsorptionswärme und der des verwendeten Lösungsmittels ab. Ist diese Differenz groß, d. h. die Adsorptionswärme der Substanz ist sehr viel größer als die des Lösungsmittels, so wird sie sehr stark zurückgehalten und nur sehr langsam eluiert. Ist die Adsorptionswärme der Substanz gleich oder kleiner als die des Lösungsmittels, so wird sie nicht mehr festgehalten, sondern sie "bricht durch". Für die adsorptionschromatographische Trennung soll daher zur anfänglichen Adsorption der Stoffe ihre Adsorptionswärme sehr viel größer sein als die des Lösungsmittels. Man verwendet daher am Anfang ein Lösungsmittel mit kleiner Adsorptionswärme. Durch stetige Steigerung der Adsorptionswärme des Lösungsmittels, durch Übergang zu stärker adsorbierten polareren Lösungsmitteln wird die Differenz der Adsorptionswärmen verringert und die Stoffe werden eluiert.

Verbindungen, die nur eine sehr kleine Adsorptionswärme

haben, können daher in der Flüssigchromatographie mit Lösungsmitteln nicht mehr getrennt werden, da die Differenz der Adsorptionswärmen zu gering ist. Für ihre Trennung verwendet man dann als mobile Phase Gase, die selbst kaum adsorbiert werden, also nur eine äußerst kleine Adsorptionswärme ergeben (Gaschromatographie). Um eine günstige Trennung zu erhalten, muß die Adsorption reversibel und schnell verlaufen, das ist jedoch nur dann der Fall, wenn die Adsorptionsenergie gering ist.

Bestimmung der elutropen Reihe.

Um eine Trennung durchführen zu können, braucht man allerdings nun nicht mehr die Adsorptionswärmen der Lösungsmittel und der zu trennenden Substanzen bestimmen, sondern man kann die empirisch aufgestellten Lösungsmittelreihen, die elutropen Reihen^{51, 52} verwenden, in denen die Lösungsmittel nach steigender Polarität geordnet sind. Diese Reihen wurden so aufgestellt, daß man die Größe der Retention einzelner Stoffe in verschiedenen Laufmitteln bestimmte. Wird die Substanz stark zurückgehalten, so ist das Laufmittel nur schwach eluierend, wird die Substanz weniger stark zurückgehalten, so ist das Lösungsmittel stärker eluierend. Diese Reihen sind also nach der Differenz der Adsorptionswärmen von Substanz und Lösungsmittel geordnet. Schwach eluierend entspricht einer großen Differenz, stark eluierend einer kleinen.

Bei der Adsorptionschromatographie von Farbstoffen wurde keine lineare Abhängigkeit des Retentionsvolumens von der Temperatur gefunden. Die Adsorptionswärme ist also von der Temperatur abhängig. Sie wird mit steigender Temperatur geringer. Dadurch besitzt man die Möglichkeit, durch Steigerung der Temperatur die Elution der Stoffe zu beschleunigen. Eine Steigerung der Temperatur entspricht einem Übergang zu einem stärker eluierenden Laufmittel. Um diesen Einfluß der Temperaturerhöhung mit der

eluotropen Reihe vergleichen zu können, wurde diese für p-Aminoazobenzol und Sudan III an Al_2O_3 (Woelm) basisch, 3% Glycerin aufgestellt.

Tabelle II a

Retentionsvolumina für p-Aminoazobenzol
mit verschiedenen Laufmitteln bei 20° C.

Tetrachlorkohlenstoff	≈ 1250 ml
Xylol	264 ml
Toluol	199 ml
Di-n-butyläther	184 ml
Benzol	136 ml
Benzol, 10% Chloroform	103 ml
Benzol, 20% Chloroform	75 ml
Benzol, 30% Chloroform	71 ml
Benzol, 50% Chloroform	65 ml
Methylenchlorid	61 ml
Benzol, 75% Chloroform	56 ml
Chloroform	55 ml
Aceton	55 ml
Äthanol	48 ml

Tabelle II b

Retentionsvolumina für Sudan III mit
verschiedenen Laufmitteln bei 20° C.

Tetrachlorkohlenstoff	138 ml
Xylol	88 ml
Di-n-butyläther	69 ml
Toluol	56 ml

Ein Vergleich der Retentionsvolumina aus Abb. 7 mit den Werten in Tabelle II zeigt, daß eine Erhöhung der Temperatur um 50° (von 15° auf 65° C) eine Verringerung des Retentionsvolumens von ca. 260 ml auf ca. 100 ml bringt. Eine gleichartige Änderung erhält man, wenn man an Stelle

von Xylol (264 ml) Benzol mit 10% Chloroform (102 ml) als Laufmittel verwendet.

Tabelle II zeigt aber auch, daß die Lösungsmittelreihen nicht universell gültig sind. Für p-Aminazobenzol ist Toluol ein schwächeres Elutionsmittel als Di-n-butyl-äther, während Sudan III von Toluol schneller eluiert wird als vom Äther. Beim Zusammenspiel von Adsorptionsmittel, Lösungsmittel und Substanz macht sich hier die chemische Konstitution der adsorbierten Substanz bemerkbar. Dieser wichtige Einfluß, der nicht systematisch erfaßbar und auch nicht vorausszusagen ist, wird bei allen theoretischen Erörterungen der chromatographischen Trennungen nicht berücksichtigt, woraus die häufig mangelnde Übereinstimmung zwischen berechneten und experimentellen Ergebnissen resultiert.

Eine Temperaturerhöhung hat auf das Retentionsvolumen den gleichen Einfluß wie der Zusatz eines polareren Lösungsmittels zum Elutionsmittel. Damit hat man also die Möglichkeit, durch Steigerung der Temperatur die Elution von Substanzen zu beschleunigen und die Dauer der Trennung zu verkürzen, ohne das Laufmittel zu verändern.

Einfluß der Temperaturerhöhung auf die Bandenform.

Die Änderung der Temperatur beeinflusst auch die Bandenform. Betrachtet man die Elutionskurven (Abb. 10), die

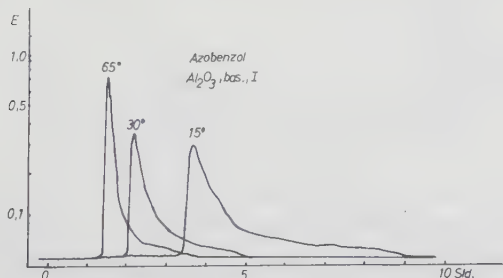


Abb. 10:
Elutionskurven
von
Azobenzol.

man von 1 mg Azobenzol bei verschiedenen Temperaturen an einer Säule mit Al_2O_3 (Woelm) basisch, Aktivität I erhält (Laufmittel Xylol), so stellt man nicht nur fest, daß sich die Retentionszeit von etwa 4 Stunden auf etwa 1 1/2 Stunden verringert, sondern daß auch die Breite der Bande geringer wird. Die Elutionskurven werden mit steigender Temperatur schmaler. Das Verhalten der anderen Farbstoffe (Sudan II, Sudan III und p-Aminoazobenzol) an Al_2O_3 , jetzt mit 3% Glycerin vorbelegt, ist ähnlich:

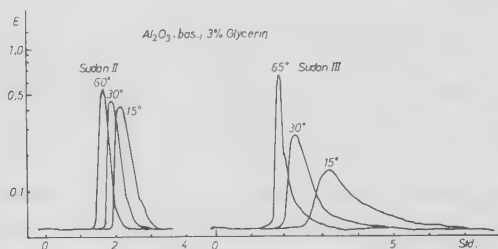


Abb. 11: Elutionskurven von Sudan II und Sudan III (1 mg).

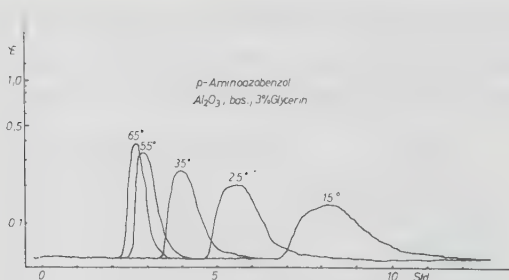


Abb. 12: Elutionskurven von p-Aminoazobenzol (1 mg).

Man erhält hier auch bei tiefen Temperaturen symmetrische Banden als an Aluminiumoxid der Aktivität I.

Durch die Vorbelegung mit Glycerin wurden die aktivsten Zentren, die die starke Verzögerung der Substanz am Ende der Bande hervorrufen, ausgeschaltet. Nur Sudan III (Abb. 11) neigt bei tiefen Temperaturen zu starkem "tailing", das sicher nicht vom Adsorptionsmittel abhängt, sondern eher eine Eigentümlichkeit der chemischen Konstitution dieser Verbindung ist. Auch bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel fällt Sudan III wegen seiner großen Neigung zur Schwanzbildung auf. Bei höherer Temperatur erhält man mit Sudan III sehr symmetrische Peaks. Auch hier scheint bei höherer Temperatur, wie bei der Ionenaustauschchromatographie der Aminosäuren, der Einfluß der chemischen Konstitution zu entfallen.

Die Asymmetrie einer Bande kann man wie folgt angeben: Die Senkrechte durch das Bandenmaximum auf die Nulllinie teilt die Breite in halber Höhe in zwei Strecken AM und ME (siehe Abb. 3, Seite 5). Der Quotient ME/AM ist ein Maß für die Asymmetrie (As). Bei symmetrischen Banden erhält man $As = 1$, für asymmetrische ist stets $As > 1$.

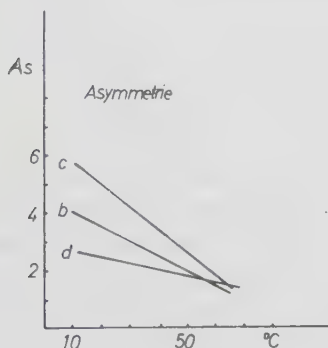


Abb. 13:
Asymmetrie der Banden
von
Azobenzol (c),
Sudan III (b) und
p-Aminoazobenzol (d)
in Abhängigkeit von
der Temperatur

In Abb. 13 ist die Asymmetrie von Substanzbanden als Funktion der Temperatur aufgetragen. Dabei zeigt sich,

daß die Asymmetrie mit steigender Temperatur sinkt. Bei höherer Temperatur erhält man fast symmetrische Peaks ($As = 1$), wie man sie auch erhält, wenn der Trennung eine lineare Isotherme zugrunde liegt. Die starke Verzögerung der Substanz am Ende der Bande, die vor allem bei der Chromatographie von Azobenzol an einem Oxid der Aktivität I auffällt, ist in diesen Asymmetriewerten nicht enthalten, da ihr Wert in halber Höhe der Bande bestimmt wurde, wo die Banden noch verhältnismäßig symmetrisch sind, während das starke tailing erst im letzten Viertel der Zone beginnt.

Abhängigkeit der Bodenzahl von der Temperatur.

Nach der Bodentheorie von A. J. P. Martin^{5, 6} läßt sich aus der Basisbreite und der Retentionszeit der Bande die Bodenzahl berechnen. Nach einem Vorschlag von E. Cremer⁷ verwendet man bei asymmetrischen Peaks zweckmäßig an Stelle der Basisbreite die Breite in halber Höhe. Die angegebenen Bodenzahlen wurden nach Gleichung (3) (Seite 6) berechnet.

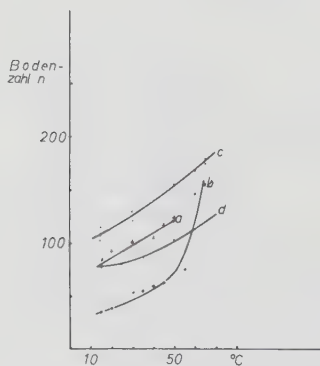


Abb. 14:
Abhängigkeit der
Bodenzahl von der
Temperatur.
(a) Sudan II,
(b) Sudan III,
(c) Azobenzol und
(d) p-Aminoazobenzol.

Die Bodenzahlen (Abb. 14) wurden alle in der gleichen Säule bestimmt, die stets 45 cm hoch mit Aluminiumoxid

gefüllt war. Die Kurve für Azobenzol (c) wurde an Al_2O_3 der Aktivität I, die für die anderen Farbstoffe an einem Oxid mit 3% Glycerin bestimmt. An einer Säule der Aktivität I erhält man Bodenzahlen zwischen 110 und 180, daraus berechnet sich eine Bodenhöhe von 4,1 bzw. 2,5 mm. An der mit Glycerin belegten Säule erhält man sowohl für Sudan II (a) als auch für p-Aminoazobenzol (d) Bodenzahlen zwischen 80 und 120, was einer Höhe der Trennstufe von 5,6 bzw. 3,75 mm entspricht. Nur für Sudan III erhält man niederere Bodenzahlen zwischen 35 und 75, da dieser Farbstoff zur Schwanzbildung neigt. Hier erhält man nur Bodenhöhen zwischen 12,8 und 6,4 mm. Nur bei Temperaturen über 60°C wurden für Sudan III auch Bodenzahlen um 150 bestimmt (Bodenhöhe etwa 3 mm). Wie sich bei den Werten für die Asymmetrie gezeigt hat, nimmt die Neigung zur Schwanzbildung bei höherer Temperatur plötzlich ab.

Bei Oxiden höherer Aktivität erhält man wohl größere Bodenzahlen in der Säule und damit eine geringere Höhe der Trennstufe, aber die Substanz am Ende einer Bande wird gegenüber der Hauptmenge stark verzögert. An dieser Störung sind die hoch aktiven Zentren beteiligt, die durch die Vorbelegung mit Wasser bzw. Glycerin ausgeschaltet werden. Durch die Vorbelegung verringert sich wohl die Bodenzahl, das starke tailing der Banden aber verschwindet. Für die Trennung ist das sicher von größerer Bedeutung als etwa 50 Böden mehr in der Säule, denn durch die starke Schwanzbildung kann eine nachfolgende Substanz nur sehr schwierig rein erhalten werden, da leicht Überlappung mit der verzögerten Substanz am Ende der vorhergehenden Bande auftreten kann. Man erhält also bei hohen Aktivitäten große Bodenzahlen, aber, durch das starke tailing, schlechtere Trennungen, so daß es zweckmäßig ist, die Vorteile der vorbelegten Oxide auszunutzen. Außerdem sinkt durch diese Vorbelegung die

katalytische Aktivität des Aluminiumoxids, die sich vor allem bei höheren Temperaturen störend bemerkbar macht.

Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf die Bodenhöhe.

Die Temperaturerhöhung bewirkt also einmal eine Verringerung des Retentionsvolumens und zum anderen eine Verbesserung der Trennung durch Erhöhung der Bodenzahl. Mit der Steigerung der Temperatur sinkt aber auch die Viskosität des Laufmittels. Dadurch steigt die Strömungsgeschwindigkeit bei gleichem Druckabfall längs der Säule. Nach der van-Deemter-Gleichung vergrößert eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit die Bodenhöhe. Durch die Verringerung der Viskosität steigt aber auch die Diffusionsgeschwindigkeit der Substanz in der Lösung an und dadurch erhöht sich die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung. Da auch die Geschwindigkeit des Adsorptions- Desorptionsvorgangs mit der Temperatur steigt, verringert sich die Konstante C der van-Deemter-Gleichung. Man erhält also zwei Effekte, die sich überlagern; einmal eine Vergrößerung der Bodenhöhe durch Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit, zum anderen die Verringerung der Bodenhöhe durch Beschleunigung des Massenübergangs.

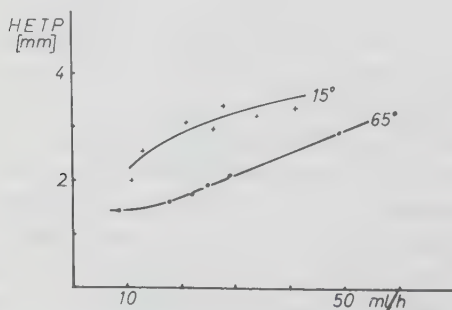


Abb. 15:
Abhängigkeit
der Bodenhöhe
von der
Strömungsge-
schwindigkeit.

In Abb. 15 ist die Abhängigkeit der Bodenhöhe von der

Strömungsgeschwindigkeit bei zwei verschiedenen Temperaturen aufgetragen. (1 mg Azobenzol an Al_2O_3 (Woelm), basisch, Aktivität I; Laufmittel Xylol). Wie zu erwarten, vergrößert sich die Höhe der Trennstufe mit steigender Strömungsgeschwindigkeit. Die Kurve, die bei höherer Temperatur aufgenommen wurde, ist zu niedrigeren Bodenhöhen verschoben. Die Steigerung der Strömungsgeschwindigkeit durch Verringerung der Viskosität beträgt beim Übergang von 15° auf 65° C etwa 7 ml/Std. Dadurch vergrößert sich, bei isothermem Betrieb, die Höhe der Trennstufe um 0,25 bis 0,5 mm. Gleichzeitig verringert sich aber die Bodenhöhe bei Temperaturerhöhung teilweise um über 1 mm, so daß trotz Steigerung der Strömungsgeschwindigkeit noch eine Verbesserung der Trennung durch Temperaturerhöhung möglich ist.

Zwei Beispiele mögen das verdeutlichen: Bei einer Temperaturerhöhung von 15° auf 65° C stieg die Strömungsgeschwindigkeit von 36 ml/Std auf 45 ml/Std an. Für 36 ml/Std und 15° C ergibt sich eine Bodenhöhe von etwa 3,3 mm, während bei 65° C und einer Strömung von 45 ml/Std die Höhe der Trennstufe nur noch 2,7 mm beträgt. Bei kleineren Strömungsgeschwindigkeiten ist der Unterschied noch größer. Für eine Strömung von 19 ml/Std bei 15° C erhält man eine Bodenhöhe von 2,8 mm. Durch die Temperaturerhöhung auf 65° C stieg die Strömungsgeschwindigkeit auf 25 ml/Std an. Hier beträgt die Höhe der Trennstufe aber nur noch 1,9 mm. Aus diesen Werten zeigt sich, daß der Einfluß der Temperaturerhöhung auf die Steigerung der Geschwindigkeit des Massenübergangs den der Verringerung der Viskosität und der damit verbundenen Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit überwiegt. Es ist also nicht unbedingt notwendig, bei Elution durch Temperaturerhöhung die Strömungsgeschwindigkeit konstant zu halten, was sicher mit großem technischen Aufwand verbunden wäre.

Der nach der van-Deemter-Gleichung bei kleinen Strömungsgeschwindigkeiten zu erwartende Anstieg der Bodenhöhe wurde nicht gefunden. Er dürfte in der Flüssigchromatographie, im Gegensatz zur Gaschromatographie, nur bei extrem niedrigen Strömungen zu finden sein, da in der flüssigen Phase der Diffusionskoeffizient, der diese Störung hervorruft, 10^5 -mal kleiner ist als in der Gasphase¹².

Einfluß der Temperatur auf die Form der Isotherme.

Die Temperatur hat auch einen Einfluß auf die Form der Adsorptionsisotherme. Mit steigender Temperatur werden die Isothermen immer flacher, aber gleichzeitig wird ihr linearer Bereich größer.

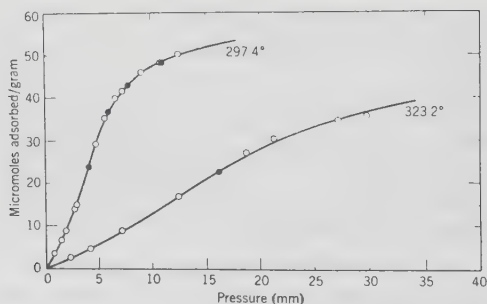


Abb. 16: Adsorption von Chloroform an Aktivkohle⁵³.

Abb. 16 zeigt zwei Isothermen für die Adsorption von Chloroform an Aktivkohle, bei etwa 20° C (297,4° K) und bei etwa 50° C (323,2° K). Die adsorbierte Menge nimmt mit steigender Temperatur ab, dagegen erstreckt sich das lineare Gebiet über einen größeren Konzentrationsbereich.

Die Adsorptionsisotherme, die an einer heterogenen Oberfläche bestimmt wurde, nähert sich bei Erhöhung der Temperatur derjenigen, die an einer vollkommen homogenen

Oberfläche erhalten wurde⁵³. Bei höherer Temperatur ist die Adsorptionsenergie auch an einer heterogenen Oberfläche unabhängig von der Belegung und die Adsorption folgt dem Henryschen Gesetz, d. h. die Adsorption ist proportional der Konzentration. Bei niedrigerer Temperatur folgt die Adsorption, im gleichen Bereich kleiner Konzentration, nicht mehr dem Henryschen Gesetz und die Adsorptionsenergie wird von der Bedeckung abhängig⁵⁴. Es erscheint also so, als ob die Adsorption bei höherer Temperatur an einer einheitlichen Oberfläche erfolgen würde. Dies zeigen auch die Untersuchungen von E. Killmann und G. Schneider⁵⁵, die fanden, daß vor allem der Aufbau höherer Adsorptionsschichten stark temperaturabhängig ist. Die monomolekulare Schicht wird stets gleichmäßig aufgebaut, während die höheren Adsorptionsschichten bei Temperaturerhöhung nicht mehr ausgebildet werden.

Bei niedrigeren Temperaturen, bei denen die Adsorption der gekrümmten Isotherme folgt (Konzentrationsabhängigkeit der Adsorption), macht sich störend bemerkbar, daß geringe Substanzmengen relativ stärker adsorbiert werden als größere. Bei höherer Temperatur (Gültigkeit des Henryschen Gesetzes) ist die Stärke der Adsorption unabhängig von der Konzentration. Daher neigen bei tiefer Temperatur die Banden zur Ausbildung eines starken "tailings", während bei höherer Temperatur diese Neigung verschwindet und man symmetrische Zonen erhält, ähnlich wie bei der Verteilungschromatographie. Die Temperatur, ab der das Henrysche Gesetz gilt, liegt bei der Adsorption aus flüssiger Phase nicht sehr hoch. So fanden L. Wöhler und W. Wenzel⁵⁶, daß für die Adsorption von Glucose an Aktivkohle bereits bei 80° C das Henrysche Gesetz gilt.

Abhängigkeit des Retentionsvolumens von der Substanzmenge.

Aus der Abhängigkeit der Adsorption von der Substanzmenge

ergibt sich eine Verringerung des Retentionsvolumens mit steigender Belastung. Im Grenzfall, bei extrem hoher Belastung, bricht die Substanz mit der Lösungsmittelfront durch. Nur bei einer linearen Abhängigkeit der Sorption eines Stoffes von der Konzentration (lineare Isotherme) ist das Retentionsvolumen von der Substanzmenge unabhängig.

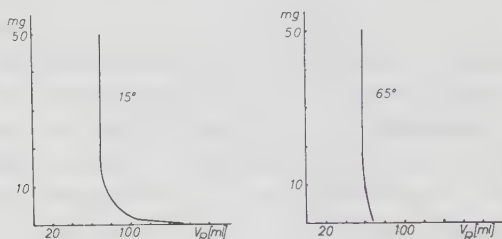


Abb. 17: Abhängigkeit des Retentionsvolumen von der Substanzmenge.

Abb. 17 zeigt die Abhängigkeit des Retentionsvolumens von der angegebenen Probenmenge für Azobenzol an Al_2O_3 (Woelm), basisch, Aktivität I, bei 15° und bei 65° C. Bei 15° C findet man im Gebiet zwischen 0,5 und 20 mg eine starke Abhängigkeit des Retentionsvolumens von der Probengröße. Es fällt von 153 auf 70 ml ab. Bei 65° C dagegen zeigt sich, im gleichen Konzentrationsbereich, nur noch eine geringe Veränderung des Retentionsvolumens um etwa 10 ml. Dies ist ebenfalls ein Hinweis dafür, daß man bei höherer Temperatur eine nahezu lineare Abhängigkeit der adsorbierten Menge von der Konzentration annehmen darf. Das Henrysche Gesetz gilt also bei höheren Temperaturen auch für die Adsorption an so heterogenen Oberflächen wie von Aluminiumoxid.

Bei höheren Konzentrationen bleibt das Retentionsvolumen fast konstant. Dieses Ergebnis ist überraschend, denn es ist nicht einzusehen, warum bei großen Probenmengen das

Retentionsvolumen bei der Adsorptionschromatographie nicht mehr von der aufgegebenen Menge abhängig ist. Eine Erklärung dafür mag folgende sein: Gibt man die Probe auf die Trennsäule auf, so bildet sich eine Primärzone aus, in der, bei der großen Substanzmenge, sicher die Sättigung des Adsorbens erreicht wird. Die Größe dieser Primärzone hängt von der Substanzmenge ab. Ihre Länge (in Säulenachse) wird nur sehr geringfügig von der Menge beeinflusst, denn es bildet sich sicherlich nicht nur eine monomolekulare Schicht der Substanz aus, sondern es werden sich mehrere Schichten übereinander lagern. Aus dieser Primärzone fließt anscheinend bei der Elution, dem Nachwaschen mit reinem Lösungsmittel, stets eine Lösung gleichbleibender Konzentration, wahrscheinlich eine gesättigte Lösung, nach unten ab, so daß die Trennung, unabhängig von der ursprünglich aufgegebenen Substanzmenge, stets mit einer Lösung konstanter Konzentration durchgeführt wird. Es hat den Anschein, daß nicht die aufgegebene Menge, sondern die Substanzmenge, die in der aus der Primärzone abfließenden Lösung enthalten ist, die Konzentrationsabhängigkeit des Retentionsvolumens bestimmt. Bei kleineren Substanzmengen (unter 20 mg) hängt die Konzentration der aus der Primärzone ausfließenden Lösung noch von der aufgegebenen Probemenge ab. Scheinbar reicht die Substanzmenge noch nicht aus, um eine gesättigte Lösung zu geben. Daher ist hier noch das Retentionsvolumen von der ursprünglichen Substanzmenge abhängig.

Abhängigkeit der Bodenzahl von der Substanzmenge.

Die Bodenzahl einer Trennsäule hängt stark von der aufgegebenen Substanzmenge ab. Abb. 18 zeigt diese Abhängigkeit für Azobenzol an einer Säule mit Al_2O_3 (Woelm), basisch, Aktivität I, mit Xylol als Laufmittel. Ab einer bestimmten Probengröße allerdings (zwischen 20 und 30 mg) verschlechtert sich die Trennleistung bei weiterer Stei-

gerung der Substanzmenge nicht mehr. Dies ist sicher auf die gleiche Ursache zurückzuführen, die bereits bei der Abhängigkeit des Retentionsvolumens von der Substanzmenge besprochen wurde. Auch hier scheint, bei genügend großer Probe, die aus der Primärzone abfließende Gleichgewichtslösung, deren Konzentration unabhängig von der aufgegebenen Substanzmenge ist, die Bodenzahl zu bestimmen.

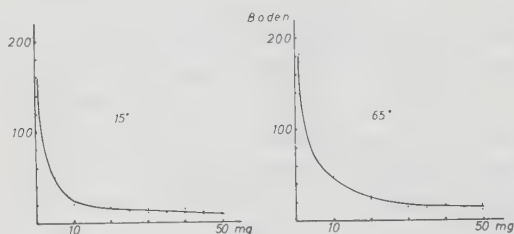


Abb. 18: Abhängigkeit der Bodenzahl
von der Substanzmenge.

Auffallend an diesen Kurven ist vor allem der starke Abfall der Bodenzahl im Bereich der kleinen Substanzmengen. So erhält man bei der Aufgabe von 10^{-5} gr Substanz pro Gramm Sorbens (0,5 mg) in der Trennsäule mehr als 150 Böden. Steigt die Substanzmenge um das 10-fache an, 10^{-4} gr Substanz/gr Sorbens (5 mg), so sinkt die Bodenzahl auf etwa 50 ab. Steigert man die Probenmenge nochmals um das 10-fache, 10^{-3} gr/gr (50 mg), so erhält man in der gleichen Säule nur noch zwischen 15 und 20 Böden. Der Temperatureinfluß ist nicht sehr groß, der Abfall der Bodenzahlen ist bei tiefer Temperatur etwas steiler als bei höherer.

Bei der Durchführung von präparativen Trennungen in der Säule gibt man im allgemeinen etwa 0,1 bis 1% Substanz auf, bezogen auf die stationäre Phase (10^{-3} bis 10^{-2} gr/gr). Man arbeitet also in einem Gebiet mit geringer Bodenzahl.

Es ist daher nicht verwunderlich, daß die Dünnschichtchromatographie, bei der üblicherweise nur etwa 10^{-5} bis maximal 10^{-4} gr Substanz/ gr Sorbens getrennt werden, in der Trennleistung der Säulenchromatographie überlegen ist.

Ein weiterer Vorteil der Dünnschichtchromatographie liegt darin, daß man bei der Trennung dieser kleinen Substanzmengen im linearen Gebiet der Adsorptionsisotherme arbeitet. Nach L. R. Snyder befindet man sich noch bei einer Substanzmenge von 10^{-4} gr/ gr Sorbens im linearen Gebiet der Isotherme¹⁵. Man kann bei der Dünnschichtchromatographie bei Raumtemperatur im Gebiet der linearen Isotherme arbeiten, das man bei der Säulenchromatographie mit größerer Belastung erst bei höherer Temperatur erreicht. Das Gebiet dieser geringen Substanzmenge, in dem man eine lineare Isotherme erhält, ist für die Säulenchromatographie wertlos, denn man kann viel zu wenig Substanz trennen. In diesem Gebiet ist die analytische Trennung auf der Dünnschicht einfacher und schneller durchzuführen als die Säulenchromatographie. Trotzdem kann man in diesem Gebiet der linearen Isotherme auch präparative Trennungen durchführen, wenn man ein sehr schwach eluierendes Lösungsmittel verwendet, das immer nur sehr wenig Substanz aufnimmt. Allerdings ist der Zeitaufwand für die Durchführung einer solchen Trennung außergewöhnlich hoch. Man wird diese Methode nur bei sehr komplizierten Trennungen oder bei unbeständigen Substanzen anwenden, die sich bei erhöhter Temperatur zersetzen. Denn es ist einfacher, die Linearität der Isotherme durch Temperaturerhöhung zu erreichen, wobei sich noch als zusätzlicher Vorteil ergibt, daß bei erhöhter Temperatur der Zeitaufwand für eine Trennung sehr viel geringer ist.

Einfluß der Temperatur auf das Zonenprofil. Störungen im Zonenverlauf.

Eine weitere Verschlechterung der Trennleistung gegenüber der Dünnschichtchromatographie bewirken bei der Säulenchromatographie die Störungen im Zonenverlauf (siehe Seite 12).

Bei der Adsorptionschromatographie von Farbstoffen an einer Kieselgelsäule, die mit einigen Lösungsmitteln (Benzol, Chloroform) durchscheinend wird, kann man beobachten, daß die Substanzzone in der Mitte der Säule schneller wandert als am Rande. Dieser Vorlauf wurde auf Unterschiede in der Strömung des Lösungsmittels zwischen den einzelnen Körnern und zwischen den Körnern und der Wand zurückgeführt⁵⁷. Dies ist aber keine Erklärung dafür, warum die Größe des Vorlaufes von der Strömungsgeschwindigkeit abhängt. Bei großen Strömungsgeschwindigkeiten ist der Vorlauf in der Mitte sehr groß, während bei geringen Strömungen kaum ein Vorlauf in der Mitte zu beobachten ist.

Da bei der Adsorption Wärme frei wird, muß sich in der Trennsäule beim Durchtritt einer Bande die Temperatur erhöhen und bei der nachfolgenden Desorption erniedrigen. Die Aufnahme des Temperaturverlaufes am Ende der Säulenfüllung wurde als Nachweismethode für die Elution von Substanzzonen beschrieben^{58, 59}. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß jede Änderung des Lösungsmittels eine Substanzzone vortäuscht, da auch beim Übergang zu einem polareren Lösungsmittel Adsorptionswärme frei wird.

Die Säulenfüllung (Al_2O_3) und die verwendeten Lösungsmittel sind mäßige Wärmeleiter, daher muß ein Temperaturunterschied zwischen der Wand, wo die Wärme schnell und leicht an die Umgebung abgegeben werden kann, und der Mitte der Säule, wo die Wärme nur langsam abgeführt werden kann, zu bemerken sein. Es wurde versucht, die Tem-

peratur längs der Säulenachse und, auf gleicher Höhe, am Rand der Säule zu messen. Dazu wurden in ein Aluminiumrohr (5,5 cm innerer Durchmesser) auf drei verschiedenen Ebenen (Abstand untereinander 25 cm) jeweils zwei Thermoelemente (Eisen-Konstantan, Durchmesser 1 mm) so eingebaut, daß das eine Thermopaar den Temperaturverlauf etwa 2 mm vom Rand entfernt bestimmte, während das andere den Temperaturverlauf in der Säulenmitte anzeigte. Die Thermospannungen wurden nach dem Kompensationsverfahren verstärkt und mit einem Sechspunktschreiber registriert.

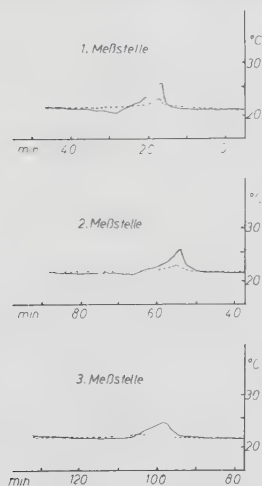


Abb. 19:
Temperaturverlauf
beim Durchtritt
einer Bande am
Rand (---) und in
der Mitte (—)
der Säule.

Abb. 19 zeigt den Temperaturverlauf an den drei Meßstellen bei der Chromatographie von 20 gr p-Methoxyazobenzol an 1400 gr Al_2O_3 (Woelm), neutral, Aktivität I, mit Benzol in die Säule eingeschlämmt; Laufmittel ist ebenfalls Benzol. Über der ersten Meßstelle befand sich eine etwa 2 cm hohe Schicht des Adsorptionsmittels. Trotzdem wird hier das Maximum noch etwa gleichzeitig erreicht, jedoch ist die Temperatur am Rand etwa um 3° niedriger

als in der Mitte der Säule. Nach dem Maximum sinkt in der Säulenmitte die Temperatur unter die Ausgangstemperatur ab. Durch die Desorption der Substanz wird Wärme verbraucht, daher kühlt sich das Sorbens ab. Das nachfolgende Lösungsmittel liefert die Wärme wieder nach, so daß erst nach einiger Zeit die Ausgangstemperatur wieder erreicht wird. An der zweiten Meßstelle beträgt die Temperaturdifferenz zwischen Rand und Mitte ebenfalls etwa 3°C . Das Maximum wird aber am Rand ungefähr 2 Minuten später erreicht als in der Mitte. Die Bande braucht, um die Entfernung zwischen beiden Meßstellen (Abstand 25 cm) zurückzulegen, etwa 37 Minuten. Daraus berechnet sich eine Wandergeschwindigkeit der Bande von 0,68 cm/min. In den zwei Minuten, die verstreichen, bis das Maximum auch am Rand erreicht wird, ist die Substanz in der Mitte bereits 1,36 cm weiter gewandert. Noch stärker ist der Vorlauf an der 3. Meßstelle. Hier wird das Temperaturmaximum am Rand 6 Minuten später erreicht als in der Mitte. Der Temperaturanstieg ist nicht mehr so groß, da sich in der Zwischenzeit die Substanzzone verbreitert hat. Aus der Wandergeschwindigkeit der Zone zwischen der 2. und 3. Meßstelle von 0,58 cm/min berechnet sich ein Vorlauf der Mitte gegenüber dem Rand von etwa 3,5 cm. Um diesen Betrag vergrößert sich die Bodenhöhe, dadurch sinkt die Trennleistung einer Säule bei unregelmäßigen Zonenfronten. Diese Temperaturkurven wurden bei einer Strömungsgeschwindigkeit von etwa 950 ml/Std aufgenommen, bei einem gleichen Versuch mit kleinerer Strömungsgeschwindigkeit (um 300 ml/Std) wurde mit der gleichen Meßanordnung nur an der ersten Meßstelle (in der Mitte der Säule) eine schwache Temperaturerhöhung um $1,5^{\circ}\text{C}$ beobachtet. An den anderen Meßstellen konnte keine Temperaturerhöhung mehr festgestellt werden.

Bei geringer Strömungsgeschwindigkeit und langsamer

Wanderung der Zone kann die Adsorptionswärme durch Diffusion abgeführt werden. Es bildet sich kein störendes Temperaturgefälle mehr aus. Bei größeren Strömungs- und Wandergeschwindigkeiten dagegen kann die Adsorptionswärme aus der Säulenmitte nicht mehr an die Umgebung abgeführt werden. Der Substanzzone wandert dann eine Zone erhöhter Temperatur voraus. Das Retentionsvolumen der Substanz und die Viskosität der mobilen Phase sinken mit steigender Temperatur. Es ist daher nicht verwunderlich, daß in der Mitte der Säule, wo ständig eine gegenüber dem Rand erhöhte Temperatur herrscht, die Substanz und das Laufmittel schneller wandern als am Rand der Säule.

Am Ende der Zone dagegen, wo durch die Desorption eine niederere Temperatur herrscht, wird die Substanz gegenüber der Hauptmenge verzögert. Der Temperatureffekt in der Säule führt nicht nur zur Verbeulung der Bandenform, sondern auch zu einer tatsächlichen Verbreiterung der Bande.

Diese Störungen hängen nur davon ab, daß bei großer Strömungsgeschwindigkeit in der Mitte der Säule kein Temperatúrausgleich mehr möglich ist. Unterbindet man überhaupt den Temperatúrausgleich mit der Umgebung durch Isolierung der Säule, so ist auch bei großer Strömung kein Substanzvorlauf in der Mitte mehr nachzuweisen⁶⁰.

Die Form der Zone, mit dem Vorlauf in der Mitte, ein Rotationsparaboloid, ist nach den Gesetzen der Wärmeübertragung⁶¹ abhängig von der Viskosität und der Wärmeleitfähigkeit der Füllung des Rohres. Bei stark viskosen Flüssigkeiten ist das Temperaturgefälle auf eine dünne Schicht in unmittelbarer Nähe der Rohrwand konzentriert. Im Grenzfall, bei extrem guter Wärmeleitfähigkeit und geringer Viskosität, bei flüssigen Metallen, erhält man einen linearen Abfall der Temperatur. Dazwischen, bei Flüssigkeiten mittlerer kinematischer Viskosität und

mittlerer Wärmeleitfähigkeit, verteilt sich das Temperaturgefälle gleichmäßig über den Rohrquerschnitt. Durch die Strömung erhält man parabelförmige Temperaturprofile⁶².

Ein Temperatureinfluß auf das Zonenprofil wurde bei der Gasadsorptionschromatographie von stark radioaktiven Substanzen beobachtet⁶³. Eine Verbesserung wurde erreicht, als man der Säulenfüllung Metallpulver zur Erhöhung der Wärmeleitfähigkeit zumischte. Auch in der Gasverteilungschromatographie wurde mit äußerst empfindlichen Thermofühlern ein Temperatureffekt beim Durchtritt einer Bande beobachtet⁶⁴. Durch die Kondensationswärme (Erwärmung) wird die Front der Zone beschleunigt und durch die Verdampfungswärme (Abkühlung) wird das Ende der Zone verzögert. Durch diesen Temperatureffekt kommt es zu einer Verbreiterung der Zone.

Die Verschlechterung der Trennung durch den Einfluß der Adsorptionswärme kann man verhindern, wenn man sehr dünne Säulen verwendet, so daß leicht Temperatureaustausch mit der Umgebung stattfinden kann. Werden dickere Trennröhre verwendet, so muß darauf geachtet werden, daß die wärmeliefernde Reaktion langsamer abläuft als die Wärmeableitung, so daß nie ein Temperaturgefälle in der Trennsäule auftritt. Auch eine Isolierung der Säule gegen die Umgebung bringt Vorteile. Die Zone hängt dann in der Mitte nicht mehr durch, da die Temperatur am Rand und in der Mitte etwa gleich groß ist. Eine Zumischung von Metallpulver zum Sorbens ist nicht zu empfehlen, da neben katalytischen Störungen auch solche im Zonenverlauf auftreten können, da am Metallpulver kaum Adsorption zu erwarten ist. Auch durch Aufgeben von kleineren Probemengen kann man die freiwerdende Adsorptionswärme verringern. Der Temperatureffekt wurde immerhin bei einer Belastung mit 2% Substanz, bezogen auf die stationäre Phase erhalten. Bei kleineren Substanzmengen (etwa 0,01 bis 0,1%)

wurde kein Temperaturanstieg festgestellt. Man hat also durchaus Möglichkeiten, diesen Temperatureffekt auszuschalten oder zumindest ihn zu verringern. Durch die Kenntnis dieses Effektes und die Wege zu seiner Beseitigung besteht die Möglichkeit, die Trennleistung präparativer adsorptionschromatographischer Trennsäulen zu steigern.

Elution durch Temperaturprogrammierung.

Bei der Untersuchung des Temperatureinflusses auf das chromatographische Verhalten von Einzelsubstanzen zeigte sich, daß eine Temperaturerhöhung die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung steigert, die Adsorption vermindert und den linearen Bereich der Adsorptionsisotherme vergrößert. Eine Erhöhung der Temperatur ist daher gleichbedeutend mit dem Übergang zu einem stärker eluierenden Laufmittel. Eine stetige Erhöhung der Temperatur muß daher einer stetigen Steigerung der Polarität des Lösungsmittels entsprechen. Eine Temperaturprogrammierung sollte daher für die Trennung ähnliche Vorteile bringen wie die Gradient-Elution.

Bei der Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Trennung eines Farbstoffgemisches wurde bewußt der Bereich vermieden, in dem bei kleinen Substanzmengen hohe Bodenzahlen erhalten wurden, sondern es wurde die Trennung mit präparativ verwertbaren Substanzmengen durchgeführt. Das Verhältnis von Substanz zu Sorbens lag bei ungefähr 10^{-3} gr/ gr (0,1% der Menge des Adsorptionsmittels).

Aufgegeben wurden in der ersten Versuchsreihe je 10 mg von p-Methoxyazobenzol, Sudan III und p-Aminoazobenzol auf eine Säule mit 35 gr Al_2O_3 (Woelm), basisch, Aktivität II. Als Lösungsmittel wurde Xylol verwendet. Zur Aufnahme der Elutionskurve wurde der Farbstoffgehalt jeder Fraktion photometrisch bestimmt. Beim Absorptions-

maximum von Sudan III (515 nm) besitzt p-Aminoazobenzol keine merkliche Absorption mehr, so daß bei dieser Wellenlänge die Konzentration von Sudan III bestimmt werden konnte. Beim Absorptionsmaximum von p-Aminoazobenzol (348 nm) liegt ein Nebenmaximum von Sudan III; man mißt bei dieser Wellenlänge die Absorption zweier Farbstoffe. Daher wird von der bei 348 nm gemessenen Extinktion die entsprechende von Sudan III abgezogen. Die Restextinktion gibt dann den Gehalt an p-Aminoazobenzol wieder.

Im folgenden werden Elutionskurven, die bei konstanter Temperatur erhalten wurden, mit denen verglichen, die sich bei bei stetiger Temperaturerhöhung ergaben.



Abb. 20: Elution der Farbstoffe bei 15° C.

Abb. 20 zeigt die Trennung von p-Methoxyazobenzol, Sudan III und p-Aminoazobenzol bei 15° C. Bei dieser niederen Temperatur dauert es über 10 Stunden, bis alle Farbstoffe vollkommen eluiert sind. Nur p-Methoxyazobenzol wird in günstiger Konzentration erhalten, während die beiden anderen Farbstoffe als sehr verwaschene Banden eluiert werden. In keiner Fraktion (5 ml) sind mehr als 0,5 mg Substanz enthalten. Außerdem werden Sudan III und p-Aminoazobenzol nicht vollständig getrennt.

Abb. 21 zeigt die Trennung der gleichen Farbstoffe bei konstanter höherer Temperatur (65° C). Die Substanzen folgen unmittelbar aufeinander. Auch zwischen p-Methoxyazobenzol und Sudan III tritt Überlappung auf. Sudan III

und p-Aminoazobenzol sind nicht voneinander getrennt, sondern überlappen beträchtlich. Die Banden sind aber viel schärfer.

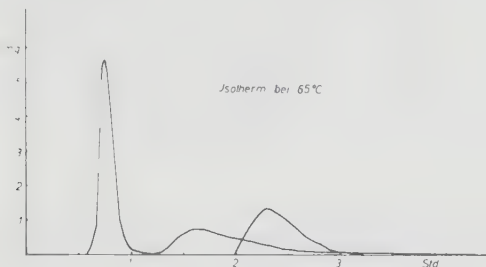


Abb. 21: Elution der Farbstoffe bei 65° C.

Um den linearen Temperaturanstieg zu erzielen, wurde am Kontaktthermometer des Umlaufthermostaten die Regeltemperatur mit konstanter Geschwindigkeit erhöht. (Vergl. experimenteller Teil). Durch Kontrollmessungen wurde festgestellt, daß der Temperaturanstieg in der Säule dem im Thermostaten entsprach.

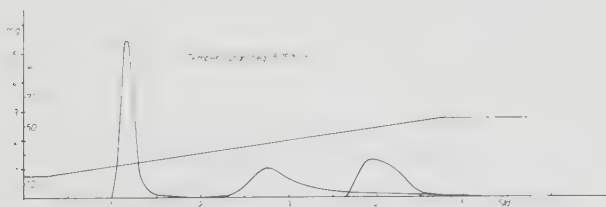


Abb. 22: Elution mit Temperaturprogrammierung.

Abb. 22 zeigt das Elutionsdiagramm, das mit programmierter Erhöhung der Temperatur erhalten wurde. Man bekommt konzentrierte Substanzzonen. Die Überlappung von Sudan III mit p-Aminoazobenzol ist nicht mehr so stark wie bei iso-

thermer Trennung, sowohl bei tiefer wie auch bei höherer Temperatur.

Nachdem diese Vorversuche günstig verlaufen waren, wurde der Einfluß der Temperatur und ihrer Änderung mit der Zeit auf die Trennung genauer untersucht. Es wurde dabei allerdings nicht mehr die Konzentration jeder einzelnen Fraktion bestimmt, sondern das Eluat der Säule lief durch eine Durchflußküvette im Strahlengang eines Photometers.

Die Anzeige des Photometers ist der Durchlässigkeit proportional; dadurch erhält man eine logarithmische Anzeige der Extinktion, so daß im unteren Bereich, bei geringen Farbstoffkonzentrationen, der Ausschlag verhältnismäßig groß ist. Gemessen wurde bei 325 nm, da hier alle Farbstoffe, bei gleicher Konzentration, nahezu gleich starke Absorption zeigen. Einer Extinktion von 0,17 entspricht bei dieser Wellenlänge eine Konzentration von 0,005 mg Sudan III/ml Lösung (gemessen in einer 1 cm Küvette). Beträgt die Schichtdicke nur 1 mm, so entspricht der gleichen Extinktion eine Konzentration von 0,05 mg/ml. Bei einer Probenmenge von 10 mg sind das nur 0,5% der Substanz, die hier noch vorliegen. Einer Extinktion von 0,08 entsprechen 0,02 mg Sudan III/ ml (Schichtdicke 1 mm).

Die Trennsäule wurde ebenfalls etwas vergrößert, damit erhöhte sich die Menge der stationären Phase auf 50 gr Al_2O_3 (Aktivität II). Als Modellsubstanzen wurden wieder die Brockmannschen Farbstoffe Azobenzol, p-Methoxyazobenzol, Sudan III und p-Aminoazobenzol (je 10 mg) verwendet. Die Farbstoffe sind in der Reihenfolge ihrer Elution geordnet. Azobenzol wird im verwendeten System bei Raumtemperatur nicht von p-Methoxyazobenzol getrennt. Aus Vorversuchen ging jedoch hervor, daß bei tieferen Temperaturen eine Trennung möglich ist. Die Durchführung

innerhalb des gleichen Versuchsprogramms scheiterte daran, daß bei tiefer Temperatur die Strömungsgeschwindigkeit stark absinkt (Zunahme der Viskosität) und durch Erhöhung des hydrostatischen Drucks keine ausreichende Strömung erhalten werden kann.

Abb. 23, 24 und 25 zeigen die Elutionskurven, die bei konstanter, aber unterschiedlicher Temperatur erhalten wurden.

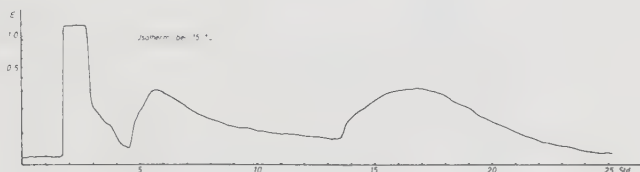


Abb. 23: Elution der Farbstoffe bei 15° C.

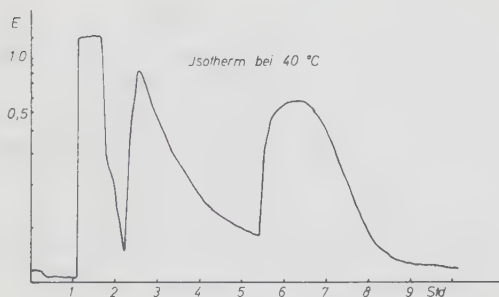


Abb. 24: Elution der Farbstoffe bei 40° C.

Der Zeitaufwand für die Durchführung der Trennung sinkt von 25 Stunden (bei 15° C; Abb. 23) auf 6 Stunden (bei 70° C; Abb. 25, Seite 56). Die Substanzzonen werden bei hoher Temperatur schmal und folgen unmittelbar aufeinander. Eine Schulter am ersten Peak (wahrscheinlich cis-Azobenzol), die bei 15° C (Abb. 23) noch deutlich sicht-

bar ist, ist bei 40°C (Abb. 24) kaum noch zu bemerken und bei 70°C (Abb. 25) vollkommen verschwunden. Bei höherer Temperatur verkürzt sich die Dauer der Trennung stark, gleichzeitig verschlechtert sich die Trennung, vor allem bei den nur schwach adsorbierten Substanzen.

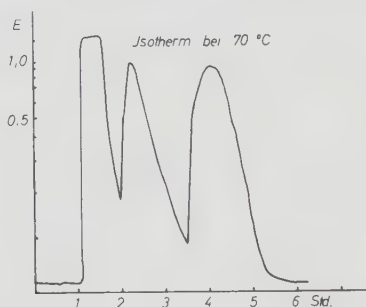


Abb. 25: Elution der Farbstoffe bei 70°C .

Anders werden die Verhältnisse, wenn man die Trennung bei niedrigerer Temperatur beginnt und während ihrer Dauer die Temperatur steigert. Die Chromatographie mit programmierter Temperaturerhöhung, die vor allem in der Gaschromatographie angewendet wird, bringt auch in der Flüssigchromatographie Vorteile. Außer einer Verkürzung der Trenndauer ergibt sich als weiterer Vorteil, daß vor allem die später abfließenden Substanzzonen nicht so stark verbreitert werden und die Substanzen im Eluat dann in konzentrierterer Form vorliegen.

Von großem Einfluß auf die Trennung ist die Geschwindigkeit des Temperaturanstiegs. In den folgenden drei Abbildungen (Seite 57) ist dieser Einfluß dargestellt.

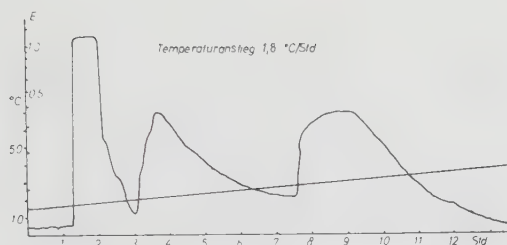


Abb. 26: Temperaturprogrammierung 15-40° C.

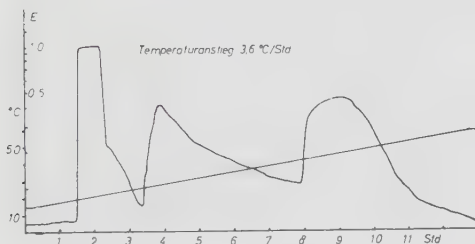


Abb. 27: Temperaturprogrammierung 15-60° C.

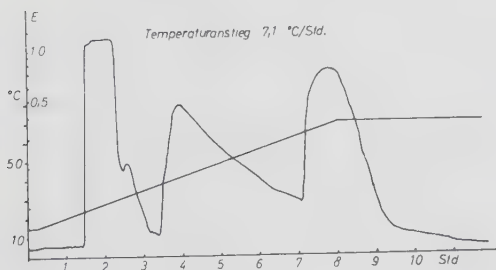


Abb. 28: Temperaturprogrammierung 15-70° C.

Zwischen den Kurven, die mit einem Temperaturanstieg von $1,8^{\circ}\text{C/Std}$ (Abb. 26) und $3,6^{\circ}\text{C/Std}$ (Abb. 27) erhalten wurden, ist der Unterschied noch nicht groß. Die einzelnen Substanzen werden etwa nach der gleichen Zeit eluiert. Auch sind die Formen der Banden sehr ähnlich. Nur die letzte Substanzzone (p-Aminoazobenzol) ist bei dem schnelleren Temperaturanstieg etwas höher und dafür schmaler. Die Substanzbande hat bei Temperaturprogrammierung etwa die gleiche Form (Breite und Höhe), die sie bei isothermer Trennung bei der entsprechenden Temperatur besitzt. Bei einer Temperaturerhöhung von $3,6^{\circ}\text{C/Std}$ wird p-Aminoazobenzol zwischen 40°C und 50°C eluiert. Die Form der Bande entspricht etwa der, die bei isothermer Trennung bei 40°C erhalten wurde (Abb. 24).

Bei schnellerem Temperaturanstieg (Abb. 28) erhält man sowohl eine vollkommene Trennung von p-Methoxyazobenzol und Sudan III als auch eine Trennung zwischen Sudan III und p-Aminoazobenzol. Die Bandenform von p-Aminoazobenzol entspricht vollkommen der, die bei isothermem Betrieb bei 70°C erhalten wurde (Abb. 25).

Der Vorteil der Temperaturprogrammierung liegt also darin, daß die schwach adsorbierten Substanzen, die bei höherer Temperatur nur schlecht getrennt werden, bei der niederen Anfangstemperatur noch vollkommen getrennt eluiert werden. Die Substanzbanden, die nur sehr langsam wandern, werden durch die Temperatursteigerung konzentriert, so daß sie in viel weniger Lösungsmittel und in kürzerer Zeit eluiert werden als bei tiefer Temperatur. Die Banden sind viel schmaler und höher und ähneln denen, die man bei isothermer Trennung bei höherer Temperatur erhält.

Das Temperaturprogramm ist am zweckmäßigsten so zu wählen, daß sowohl die schwach adsorbierten Stoffe noch vollkommen getrennt, also bei verhältnismäßig niedriger Tempera-

tur eluiert werden, als auch die stark zurückgehaltenen Substanzen ziemlich konzentriert, d. h. bei einer optimalen, verhältnismäßig hohen Temperatur eluiert werden. Allerdings darf der Temperaturanstieg nicht zu schnell erfolgen, da, wie bereits ausgeführt, die Wärmeleitfähigkeit der Säulenfüllung nicht besonders gut ist. Der Temperaturgradient von der Rohrwand zu Rohrmitte kann den entgegengesetzten, der durch die Adsorptionswärme hervorgerufen wird, teilweise aufheben, so daß die Substanzzone außen etwa gleich schnell wandert wie in der Mitte und eine Begradigung der Front erfolgt. Dieser Effekt trägt zur Verbesserung der Trennung bei.

Durch Erhöhung der Temperatur verringert sich die Adsorptionswärme und damit wird die Bindung der Substanz am Sorbens schwächer. Außerdem geht die nicht lineare Adsorptionsisotherme bei höherer Temperatur in die lineare Isotherme des Henryschen Gesetzes über. Man kann daher auch ein komplexes Gemisch aus Stoffen, die verschieden stark adsorbiert werden, mit einem einzigen Lösungsmittel trennen. Bei tiefer Temperatur werden nur die schwach adsorbierten Substanzen eluiert. Bei Temperatursteigerung schwächt sich die Adsorption der stärker adsorbierten Stoffe ab, und sie werden ebenfalls eluiert. Als weiterer Vorteil macht sich bemerkbar, daß die Adsorption bei höherer Temperatur dem Henryschen Gesetz folgt, wodurch das "tailing" der Banden verschwindet.

Die Elution durch programmierte Temperatursteigerung ähnelt der Gradient-Elution⁶⁵. Auch hier wird für eine Substanz, die im ursprünglichen Laufmittel stark adsorbiert wird und eine gekrümmte Isotherme besitzt, durch den Zusatz des stärker eluierenden Laufmittels die Adsorption verringert und die Krümmung der Isotherme abgeschwächt, bis man im Grenzfall auch hier lineare Isothermen erhält.

Bei der Elution durch Temperaturprogrammierung, wie auch bei der Gradient-Elution, wird für verschiedene Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten der Zustand der reversiblen Adsorption und die Linearität der Isotherme erreicht. Dadurch werden die Stoffe, im günstigsten Fall ohne "tailing", nacheinander eluiert. Es ist gleichgültig, ob man den Zustand der reversiblen Adsorption durch steten Zusatz eines polarereren Laufmittels erreicht oder durch Steigerung der Temperatur.

Die Elution durch Temperaturprogrammierung besitzt gegenüber der herkömmlichen Gradient-Elution den Vorteil, daß man während des Versuches die Zusammensetzung des Laufmittels nicht verändern muß, so daß es ohne große Schwierigkeiten möglich ist, die Konzentration der Stoffe im Eluat durch Bestimmung physikalischer Größen zu ermitteln. Im anderen Fall wird durch die ständige Änderung der Zusammensetzung des Laufmittels bei der Gradient-Elution die Registrierung physikalischer Daten des Eluats erschwert. Man muß in den meisten Fällen den Einfluß des Lösungsmittels kompensieren, was nur mit großem technischem Aufwand möglich ist. Durch die Mischung entfällt auch die Wiederverwendung der nicht unbeträchtlichen Lösungsmittelmengen. Auch ist die Temperaturprogrammierung experimentell einfacher durchzuführen als die Herstellung eines Lösungsmittelgradienten in einer Mischkammer.

Experimenteller Teil.

Zur Messung der Durchlässigkeit des Fluats wurde das Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss, Oberkochen) verwendet. Parallel zum eingebauten Galvanometer wurde die Spannung (0 - 5 mV) abgegriffen, mit dem Kompensationsmeßgerät GKT (Fa. Metrawatt, Nürnberg) verstärkt und mit einem Linienschreiber (Fa. Metrawatt, Nürnberg) aufgezeichnet (Papiervorschub 20 mm/Std).

Die Durchflußküvette (Schichtdicke 1 mm; Fa. Hellma, Müllheim/ Baden) war mit einem Teflonschlauch (0,7 mm innerer Durchmesser) mit der Trennsäule verbunden.

Die Fraktionen wurden mit dem Fraktionssammler Radirac der Fa. LKB-Products, Stockholm, aufgefangen.

Zur Thermostatisierung der Säule wurde ein Ultrathermostat der Fa. Gebr. Haake, Berlin, verwendet. Fassungsvermögen 40 l Wasser. Die Verbindungsschläuche zwischen Säule und Thermostat waren, um Wärmeverluste zu vermeiden, mit Moosgummi isoliert.

Zur Temperaturprogrammierung wurde das Regelthermometer des Ultrathermostaten mit einem Elektromotor langsam herausgedreht. Die Welle des Motors war mit einem Zahnradgetriebe verbunden, das Übersetzungen im Verhältnis 100 : 10 : 1 erlaubte. Die einzelnen Zahnräder dieses Getriebes konnten mit dem Regelthermometer verbunden werden. Der Temperaturanstieg wurde mit einem Thermoelement gemessen und mit einem Kompensationsschreiber registriert. Bei jedem Versuch wurde der Temperaturanstieg auf diese Weise kontrolliert.

Der Einbau der Thermoelemente zur Bestimmung des Temperaturverlaufes in der Säule erfolgte, wie bereits beschrieben¹⁷. Als Klebemittel wurde UHU-plus, ein Klebstoff auf Aralditbasis, verwendet.

Zur Registrierung der Thermospannungen wurde ein Punktschreiber mit automatischem Meßstellenumschalter der Fa. Joehns & Co., Düsseldorf, verwendet, der die gleichzeitige Registrierung von sechs verschiedenen Meßstellen gestattete. Zwischen Meßstellenumschalter und Meßwerk wurde der Kompensationsverstärker GKT mit einem Meßbereich von 0 - 2 mV geschaltet. Als Bezugstemperatur für die Thermospannungen wurde die Temperatur des schmelzenden Eises verwendet. Um den empfindlichsten Meßbereich (0 - 2 mV) ausnutzen zu können, wurde an den Meßkreis eine elektronisch konstant gehaltene Gegenspannung von 0,5 mV angelegt. Eine ausführlichere Beschreibung der Meßanordnung siehe¹⁷.

Als Adsorptionsmittel wurden ausschließlich Präparate der Fa. M. Woelm, Eschwege, verwendet. Die niederen Aktivitätsstufen wurden durch Zusatz von Wasser⁴⁸ bzw. Glycerin⁴⁹ wie folgt hergestellt:

In einen geschlossenen Kolben wurde zum Al_2O_3 der Aktivität I die berechnete Menge Wasser bzw. Glycerin gegeben. Durch Umschütteln wurde eine gleichmäßige Verteilung erreicht. Der verschlossene Kolben wurde dann stehen gelassen. Durch isotherme Destillation belegte das Wasser dann die aktivsten Zentren. Bei der Zugabe von Glycerin mußte diese isotherme Destillation bei höherer Temperatur durchgeführt werden (etwa bei $90^\circ - 100^\circ \text{C}$). Nach etwa 10 Stunden kann das Oxid verwendet werden.

Die verwendeten Lösungsmittel wurden durch Filtration über aktives Al_2O_3 gereinigt⁶⁶.

Die Farbstoffe waren Praktikumspräparate und wurden vor ihrer Verwendung chromatographisch gereinigt.

Dimension der Trennsäule: Innerer Durchmesser 1,2 cm; Länge des Heizmantels 50 cm; Füllhöhe bei 50 gr Aluminiumoxid: 45 cm.

Füllen der Säule: Die Säule wird am Hahn mit einem Watterpfropfen verschlossen. Darüber wird so hoch Seesand geschichtet, daß die Grenze Sand - Aluminiumoxid innerhalb des Heizmantels zu liegen kommt. Dann wird die Säule zu etwa einem Drittel mit Laufmittel gefüllt. Dabei ist zu beachten, daß im Seesand eingeschlossene Luftblasen entfernt werden. Das Sorbens wird mit dem gewählten Laufmittel geschüttelt, bis eine dünnflüssige Suspension entsteht (für 50 gr Al_2O_3 etwa 80 ml Lösungsmittel). Diese Suspension wird, bei geschlossenem Auslauf, möglichst in einem Guß in die Säule gefüllt. Wenn alles Oxid auf diese Weise in die Säule gebracht worden ist, wird der Auslauf geöffnet und das überschüssige Laufmittel abgelassen, wobei sich das Oxid langsam absetzt. Dann wird mehrmals leicht, von unten nach oben, an die Säule geklopft, um das Absitzen zu beschleunigen. Abschließend wird die Füllung mit einer 3 - 4 cm hohen Schicht Seesand abgedeckt. Auf diese Weise erhält man stets die gleiche Füllhöhe.

Literaturverzeichnis.

- 1.) G. Hesse, Angew. Chem., 67, 9 (1955)
- 2.) A. J. M. Keulemans, "Gaschromatographie", Verlag Chemie, Weinheim/ Bergstr. (1959)
- 3.) P. Chovin in "Chromatographie en chimie organique et biologique", Ed. E. Lederer, Masson & Cie., Paris (1959)
- 4.) S. Dal Nogare, R. S. Juvet jr., "Gas-Liquid Chromatography", Interscience Publ., New York (1962)
- 5.) A. J. P. Martin, R. L. M. Synge, Biochem. J., 35, 1358 (1941)
- 6.) A. J. P. Martin, A. T. James, Biochem. J., 50, 679 (1952)
- 7.) E. Cremer, L. Roselius, Angew. Chem., 70, 42 (1958)
- 8.) J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Chem. Engng. Sci., 5, 271 (1956)
- 9.) A. Klinkenberg, F. Sjenitzer, Chem. Engng. Sci., 5, 258 (1956)
- 10.) F. Helfferich, Chem. Ing. Techn., 34, 269 (1962)
- 11.) J. C. Giddings, Anal. Chem., 36, 1170 (1964)
- 12.) J. C. Giddings, J. Chromatogr., 13, 301 (1964)
- 13.) J. C. Giddings, Anal. Chem., 35, 2215 (1963)
- 14.) J. C. Giddings, Anal. Chem., 36, 1890 (1964)
- 15.) L. R. Snyder in "Advances in analytical chemistry and instrumentation", Vol. III, Ed. C. N. Reilley, Interscience, New York (1964)
- 16.) G. Taylor, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A, 201, 192 (1950); 245, 312 (1958).
- 17.) Diplomarbeit H. Engelhardt, Erlangen 1962
- 18.) C. E. Schwartz, J. M. Smith, Ind. Eng. Chem., 45, 1209 (1953); siehe auch A. E. Scheidegger, "The physics of flow through porous media", University of Toronto Press (1957)
- 19.) S. Hjertén, R. Mosbach, Anal. Biochem., 3, 109 (1962)

- 20.) E. B. Byrne, L. Lapidus, J. Am. Chem. Soc., 77, 6506 (1955)
- 21.) O. Vitzthum, Z. anal. Chem., 189, 66 (1962)
- 22.) A. B. Littlewood, C. S. G. Phillips, D. T. Price, J. Chem. Soc. (London), 1955, 1480
- 23.) E. Cremer, F. Prior, Z. Elektrochem., 55, 66 (1951)
- 24.) W. J. de Wet, V. Pretorius, Anal. Chem., 30, 325 (1958)
- 25.) Zusammenfassung siehe ⁴, Seite 322 ff.
- 26.) H. W. Habgood, W. E. Harries, Anal. Chem., 32, 450 (1960)
- 27.) R. M. Bethea, F. S. Adams jr., Anal. Chem., 33, 832 (1961)
- 28.) F. Helfferich, "Ionenaustauscher", Band I, Verlag Chemie, Weinheim/ Bergstr. (1959)
- 29.) S. Moore, W. H. Stein, J. Biol. Chem., 192, 669 (1951)
- 30.) J. F. Short, P. G. Smith, G. H. Twigg, J. appl. Chem., 3, 198 (1953)
- 31.) C. S. Knight, Nature 200, 1314 (1964)
- 32.) R. Dybczyński, J. Chromatogr., 14, 79 (1964)
- 33.) K. A. Kraus, R. J. Raridon, D. C. Holcomb, J. Chromatogr., 3, 178 (1960)
- 34.) L. Kesner, E. Muntwyler, G. E. Griffin, J. Abrams, Anal. Chem., 35, 83 (1963)
- 35.) H. H. Strain, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 18, 605 (1946)
- 36.) A. L. LeRosen, C. A. Rivet jr., Anal. Chem., 20, 1093 (1948)
- 37.) L. T. Chang, Anal. Chem., 25, 1235 (1953)
- 38.) V. Hesp, J. Barabas, Magyar Kém. Lapja, 10, 269 (1955)
- 39.) C. C. Tu, K. Ward jr., J. Am. Chem. Soc., 77, 4938 (1955)
- 40.) R. J. P. Williams, Analyst, 77, 905 (1952)
- 41.) N. S. Schneider, J. D. Loconti, L. G. Holmes, J. Appl. Polymer Sci., 5, 354 (1961)
- 42.) W. Schulz, Anal. Chem., 35, 2222 (1963)
- 43.) V. Desreux, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 68, 789 (1949)

- 44.) A. F. Pillsbury, Soil Sci., 70, 299 (1950)
- 45.) L. Hagdahl, R. T. Holmes, J. Am. Chem. Soc., 72, 701 (1950)
- 46.) C. H. Giles, J. J. Greczek, S. N. Nukhwa, J. Chem. Soc. (London), 1961, 63
- 47.) H. Brockmann, H. Schodder, Ber. dtsch. chem. Ges., 74, 73 (1941)
- 48.) G. Hesse, I. Daniel, G. Wohlleben, Angew. Chem., 64, 103 (1952)
- 49.) G. Hesse, G. Roscher, Z. anal. Chem., 200, 3 (1964)
- 50.) G. Beggerow, P. Harteck, Z. physik. Chem., 193, 265 (1944)
- 51.) W. Trappe, Biochem. Z., 305, 150; 306, 316 (1940)
- 52.) J. Jaques, J.-P. Mathieu, Bull. Soc. chim. France, 1946, 94
- 53.) S. Ross, J. P. Olivier, "On Physical Adsorption", Interscience, New York (1964)
- 54.) R. M. Barrer, L. V. C. Rees, Trans. Faraday Soc., 57, 999 (1961)
- 55.) E. Killmann, G. Schneider, Makromolek. Chem., 57, 213 (1962)
- 56.) L. Wöhler, W. Wenzel, Kolloid-Z., 53, 273 (1930)
- 57.) A. Stewart, Disc. Faraday Soc., 7, 65 (1949)
- 58.) J. Blumer, Anal. Chem., 32, 772 (1960)
- 59.) A. Groszek, J. Chromatogr., 3, 454 (1960)
- 60.) Zulassungsarbeit G. Hock, Erlangen 1962.
- 61.) Gröber - Erk - Grigull, "Die Grundgesetze der Wärmeübertragung", 3. Auflage, Springer Berlin (1961)
- 62.) P. Grassmann, "Grundlagen der chemischen Technik, Band I, Physikalische Grundlagen der Chemie-Ingenieur-Technik", Aarau, Frankfurt/ Main (1961)
- 63.) E. Glueckauf in D. H. Desty, "Gaschromatography 1958", Butterworth, London (1958)
- 64.) R. P. W. Scott, Anal. Chem., 35, 481 (1963)
- 65.) R. S. Alm, R. J. P. Williams, A. Tiselius, Acta chem. Scand., 6, 826 (1952)
- 66.) G. Hesse, H. Schildknecht, Angew. Chem., 67, 737 (1955)

Lebenslauf

Heinz Rudolf Engelhardt,

geboren am 31. August 1936 in Nürnberg
als Sohn des Prokuristen Hans Engelhardt und seiner
Ehefrau Elsa, geb. Gundel.

Schulbildung und Studium:

1942 - 1946 Volksschule in Schwabach

1946 - 1954 Adam-Krafft-Oberrealschule m. Gymnasium
in Schwabach;

Reifezeugnis der Oberrealschule vom
13. Juli 1954

Seit Wintersemester 1954/55 Studium der Chemie an der
Universität Erlangen - Nürnberg.

Diplom-Chemiker-Vorprüfung am 22. Mai 1958

Diplom-Chemiker-Hauptprüfung am 15. Mai 1962

Seit 15. Oktober 1962 Verwalter einer wissenschaftlichen
Assistentenstelle am Institut für organische Chemie I
der Universität Erlangen - Nürnberg.

Fotodruck

- Wiltrud Hög, Erlangen, Brüxer Straße 9, (Nähe Röthelheimbad) Telefon 1636 -